



# Modulación de la proteostasis celular por el inhibidor Ala-Ala-Phe-clorometilcetona

*Lorena López Ferreras*

Departamento de Biología Molecular  
Universidad Autónoma de Madrid  
Madrid, 2013



# **Modulación de la proteostasis celular por el inhibidor Ala-Ala-Phe-clorometilcetona**

*Memoria para optar al título oficial de Doctora  
presentada por:*

**Lorena López Ferreras**

Licenciada en Biología

*Director:* **Dr. Luis C. Antón**

Científico Titular del C.S.I.C.  
Centro de Biología Molecular Severo Ochoa

*Codirectora:* **Dra. Margarita Del Val**

Investigadora Científica del C.S.I.C.  
Centro de Biología Molecular Severo Ochoa

Departamento de Biología Molecular  
Facultad de Ciencias  
Universidad Autónoma de Madrid  
Madrid, 2013



Los trabajos de investigación que componen esta Tesis Doctoral han sido financiados por el Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica 2004-2007 (Proyecto SAF2007-60934) y el programa de Proyectos de Investigación Fundamental del Plan Nacional de I+D+i 2008-2011 (Proyecto SAF2010-18917).

La autora de esta Tesis Doctoral ha disfrutado de una ayuda Predoctoral de Formación de Personal Investigador (referencia BES-2008-009564) asociada al proyecto de investigación SAF2007-60934.



A mis padres





## **AGRADECIMIENTOS**

Parece mentira que después de tantas páginas en blanco a las que me he tenido que enfrentar a lo largo de esta Tesis esta sea una de las que más trabajo me esté costando.

En primer lugar, me gustaría agradecer al Dr. Luis C. Antón por dirigirme en esta dura etapa de formación, por enseñarme todo lo que he aprendido y ayudarme en todo momento que lo he necesitado. Gracias por acompañarme en esta etapa de mi vida.

En segundo lugar, quisiera agradecer a la Dra. Margarita del Val, por permitirme ser parte de su grupo y ofrecerme una beca FPI.

He de agradecérselo también a mis compañeros de laboratorio: Adri, Alex, Carlos, Noel y Patricia y a los compis “adoptados”, Carla, Enrique y María por estar ahí tanto a nivel laboral como personal. En el día a día me gustaría hacer una mención especial a Carlos y a Patricia por estar siempre dispuestos a echar una mano cuando yo no daba abasto con las mías. Y en lo personal, a mis chicos de la U, Alex y Carlos, por las tardes que pasamos intentando mejorar nuestro “tiro a canasta”, por las largas conversaciones y en definitiva por estar siempre ahí cuando os necesité. Y al equipo Benidorm, en el que a mis chicos de la U se unió Adri, por aceptar un viaje “fin de Tesis” que, aunque corto, para mí fue como el viaje de fin de carrera que nunca tuve.

Debo agradecérselo también a la gente de Majadahonda, al grupo de la Dra. Margarita del Val y al Dr. José Antonio López de Castro por orientarme en los largos seminarios. Sobre todo, gracias a Bego y a Manolo por los ratos que hemos compartido.

Al Dr. Alberto Paradela del Servicio de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología por su colaboración en los experimentos de espectrometría de masas.

Al Dr. Ricardo Gargini del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa por su colaboración en la realización y discusión de los experimentos de USP7.

A los doctores José J. Lucas y Jesús F. Torres Peraza del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa por su colaboración en los experimentos de estrés de retículo endoplasmático.

A la Dra. M<sup>a</sup> Jesús Bullido del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa por su colaboración en los experimentos de medida de la actividad transcripcional con gen indicador de Luciferasa.

Al Dr. Manuel Rodríguez de la fundación privada Inbiomed, por permitirme la posibilidad de realizar una estancia en su laboratorio en el Centro de Investigación Cooperativa en Biociencias-CIC bioGUNE. Al Dr. Fernando Lopitz-Otosa por su tiempo y ayuda en la realización de los experimentos y a todo el grupo en general por su cálida acogida, en especial a Elisa por las tardes compartidas fuera del laboratorio.

No me puedo olvidar de mis amigos, que en la distancia han estado siempre cerca de mí, acompañándome y apoyándome en todas las decisiones que he ido tomando a lo largo de mi vida.

A mi Lau, mi fiel confidente, mi apoyo más fuerte en León. Gracias por escucharme, por apoyarme y por aceptar el reto de hacer la portada de mi Tesis.

A Esther, por las espichas, las noches interminables pero sobretodo, por permanecer a mi lado después de una de las mejores etapas de mi vida. Por lo que vivimos y por lo que nos queda aún por vivir.

A Vero y a Ana, por transmitirme tranquilidad y responsabilidad.

A Mariam, sabes que sin ti no estaría donde estoy. Gracias por “obligarme” a buscar una beca FPI, por enseñarme la magia de las Fallas y por demostrarme que dos personas se pueden hacer inseparables en muy poco tiempo.

A Silvia, por tu apoyo, por darlo todo sin pedir nada a cambio. Por ser como eres.

A Dani y Javi por demostrarme que también existen los amigos en la gran capital.

Y a mis “*hermanos mayores*”, Davi, Pelly y Feli. Porque aunque el tiempo pase y la distancia aumente nada cambia entre nosotros.

**Pero sobretodo, quiero agradecersele a mi familia.**

**A mi padre por guiarme a lo largo de toda mi vida profesional, por sus consejos, por su ayuda y por su interminable apoyo.**

**A mi madre, por estar siempre ahí. Por todo lo que significas para mí: amor, protección y apoyo.**

**A mi hermana. Porque aunque, en nuestro caso la línea entre el amor y el odio sea prácticamente invisible, te quiero con locura y no podría vivir sin ti.**

**Y a ti, Sergio, por estar a mi lado día a día. En los buenos momentos y en los malos. Por escuchar mis interminables historias sobre lo que he hecho y he dejado de hacer. Por apoyarme cuando algo iba mal y me derrumbaba y por soportar mi mal humor cuando llegaba a casa enfadada.**

**Resulta difícil nombrar a todas las personas que de una forma u otra me han acompañado en esta aventura, soy consciente de que muchas de ellas se quedan en el tintero, sin embargo no por ello son menos importantes. Quiero agradecerles a todas ellas cuanto han hecho por mí para que este trabajo saliera adelante de la mejor forma posible.**

**Por último, gracias a tod@s l@s que en algún momento de mi vida habéis formado parte de ella.**



## **SUMMARY**

Ala-Ala-Phe-chloromethylketone (AAF-cmk) is a serine protease inhibitor that inhibits tripeptidyl peptidase II (TPPII), an enzyme that has been suggested to take up some proteasome functions when its activity is compromised. Similarly to proteasome inhibitors, AAF-cmk induces the accumulation of polyubiquitylated proteins including the formation of aggresome-like structures. This response is cell-dependent but it is not due to the inhibition of TPPII. We have proposed a working model where AAF-cmk could be acting upstream the proteasome by increasing the workload of the ubiquitin-proteasome system (UPS), which may result in a saturation of the proteasome in cells with a compromised activity of this degradative pathway.

One of the aforementioned candidates could be Hsp90. Using the geldanamycin analog 17-AAG we showed that although Hsp90 is not a target of AAF-cmk, its inhibition leads to similar effects as those obtained with AAF-cmk.

Given that the deubiquitylating activity is also upregulated in some cells with low proteasomal activity, and that its inhibition may result in an increase in the workload of the UPS, we decided to test whether AAF-cmk was affecting the activity of this group of enzymes. We have identified some activities that are inhibited by AAF-cmk such as USP7, USP14 and partially USP10.

Taking into account that AAF-cmk has selective toxicity for some tumor cell lines, we evaluated the effect of the inhibitor on proteotoxic stress. Our results showed differences in the induction of cellular stress in two osteosarcoma cell lines correlating with aggresome formation.

Furthermore, we have observed that AAF-cmk also induces alterations on the autophagy pathway, Atg4B being another of its targets.

In relation with new therapeutic targets it is important to analyze the synergism between the new drug and others which are already available. We have analyzed the effect of AAF-cmk in combination with the PI3K inhibitor, LY294002. The results showed an induction of both cell cycle arrest and cell death after AAF-cmk treatment, an effect that was enhanced by the combination of both inhibitors.



## **ABREVIATURAS**

**17-AAG:** 17-alilamino-17-demetoxigeldanamicina

**AAF-cmk:** Ala-Ala-Phe-clorometilcetona

**Akt:** proteína kinasa B

**BSA:** albúmina de suero bovino

**CHX:** cicloheximida

**DABCO:** 1,4-diazabicyclo (2.2.2) octano

**DMEM:** medio de cultivo mínimo esencial de Eagle modificado por Dulbecco

**DRiPs:** productos ribosomales defectivos

**DUB:** ubiquitín hidrolasa

**EBSS:** medio en ausencia de aminoácidos que va a simular un estado de ayuno (*Earle's Balanced Salt Solution*)

**eIF2 $\alpha$ :** factor de iniciación en eucariotas

**HA:** hemaglutinina

**LIR:** región de interacción con LC3

**PARP1:** poli-ADP-ribosa-polimerasa-1

**PBS:** Tampón fosfato salino

**PE:** fosfatidiletanolamina

**PERK:** proteína quinasa del retículo endoplasmático semejante a PKR

**PFA:** paraformaldehído

**PI3K:** fosfatidilinositol 3 kinasa

**ShCo:** vector pLKO.1 scramble

**TPPII:** tripeptidil peptidasa II

**Ub:** ubiquitina

**UBL:** similar a la ubiquitina, del inglés "*UBiquitin Like*"

**UPS:** vía Ubiquitina-proteasoma

**WB:** Western Blot





## ÍNDICE

### SUMMARY

### ABREVIATURAS

<b><u>INTRODUCCIÓN</u></b>	1
1. Vía ubiquitina-proteasoma	1
1.1. El proteasoma	1
1.1.1. Proteasoma 20S	1
1.1.2. Subunidad reguladora 19S	2
1.1.3. Inmunoproteasoma	3
1.2. Reconocimiento de sustratos	4
1.2.1. Ubiquitina	4
1.2.2. Ubiquitilación	5
2. Proteólisis lisosomal	6
2.1. El lisosoma	7
2.2. Autofagia	7
2.2.1. Mecanismo	8
2.2.2. Selección de sustratos	10
3. Proteostasis y estrés proteotóxico	12
4. Vías proteolíticas alternativas al proteasoma: La TPPII	13
5. AAF-cmk	14
6. Ubiquitín-hidrolasas	16
<b><u>OBJETIVOS</u></b>	21
<b><u>MATERIALES Y MÉTODOS</u></b>	25
1. Líneas celulares, condiciones de cultivo y tratamiento con inhibidores	25
2. Técnicas de DNA	27
2.1. Plásmidos o construcciones	27
2.1.1. Vectores lentivirales	28
2.2. Purificación de DNA plasmídico	28
2.3. Clonajes	28
2.3.1. Etiquetado y cambio de vector USP7	29
2.3.2. Etiquetado de USP14	30
2.3.3. Clonaje de la secuencia de LC3B en el vector pEYFP-C1	30
2.3.4. Construcción mCherry-EGFP-LC3B procesado ( $\Delta C$ )	31
2.3.5. Generación de Atg4B <sup>C74A</sup> por mutagénesis dirigida	31

2.4.	Transfecciones.....	32
2.4.1.	<i>Lipofectamine™ Reagent-Plus™ Reagent</i> (Invitrogen) .....	32
2.4.2.	<i>NanoJuice™ Transfection Kit</i> (Novagen) .....	32
2.5.	Silenciamiento génico: producción y transducción de vectores lentivirales. ....	32
3.	Técnicas de proteínas.....	33
3.1.	Western Blot.....	33
3.2.	Inmunoprecipitación .....	35
3.3.	Purificación por bolitas de agarosa de níquel (Ni-NTA) .....	36
3.4.	Identificación de proteínas por espectrometría de masas .....	36
4.	Ensayos de actividad enzimática.....	36
4.1.	Identificación de dianas de AAF-cmk: Vinil sulfonas .....	36
4.2.	Ensayos de actividad enzimática mediante hidrólisis de sustratos fluorogénicos.....	37
4.3.	Ensayo de desubcutilación de Mdm2 <i>in vitro</i> .....	37
4.4.	Medida de la actividad transcripcional con gen indicador de luciferasa.....	38
5.	Otras técnicas .....	38
5.1.	Citometría de flujo.....	38
5.2.	Microscopía confocal.....	38
5.3.	Microscopía electrónica .....	40
5.4.	Análisis del ciclo celular.....	40
5.5.	Cuantificación de autolisosomas con mCherry-EGFP-LC3B.....	41
<b><u>RESULTADOS</u></b> .....		45
1.	La inhibición de Hsp90 induce la formación de agresomas pero no es diana de AAF-cmk .....	45
2.	AAF-cmk inhibe algunas DUBs .....	47
3.	Caracterización de la inhibición de USP7 .....	50
3.1.	AAF-cmk induce la acumulación de p53 .....	51
3.2.	AAF-cmk promueve la inestabilidad de Mdm2.....	54
3.3.	La proteína p53 que se acumula por AAF-cmk es transcripcionalmente activa .....	55
3.4.	USP7 y la formación de agresomas.....	56
4.	USP14 afecta a la formación de agresomas.....	57
5.	AAF-cmk induce una respuesta de estrés .....	58

5.1.	Efecto de AAF-cmk sobre el estrés citosólico .....	59
5.2.	Efecto de AAF-cmk sobre el estrés de retículo.....	59
6.	Análisis del efecto de AAF-cmk sobre autofagia .....	63
6.1.	AAF-cmk induce un cambio en la distribución de YFP-LC3B, p62 y NBR1 .....	63
6.2.	AAF-cmk induce la acumulación de LC3B-II .....	67
6.3.	AAF-cmk bloquea la autofagia .....	69
6.4.	p62 se acumula en la fracción insoluble .....	71
6.5.	p62 afecta a la sensibilidad a AAF-cmk en la formación de agresomas .....	72
6.6.	Efecto de AAF-cmk sobre los niveles de p62 y NBR1 en las líneas celulares 143B-TK <sup>-</sup> y U-2 OS .....	74
6.7.	Caracterización de Atg4B como diana de AAF-cmk.....	75
6.7.1.	La sobreexpresión de Atg4B induce una mayor sensibilidad a AAF-cmk .....	77
6.7.2.	AAF-cmk podría estar afectando al reciclaje de LC3-II .....	78
7.	Sinergismo con fármacos moduladores de vías de control celular .....	80
<b><u>DISCUSIÓN</u></b> .....		87
1.	Identificación de ubiquitín-hidrolasas como dianas de AAF-cmk .....	87
2.	Efecto de AAF-cmk sobre la función celular de USP7 .....	88
3.	Efecto de los niveles de USP14 en la formación de agresomas por AAF-cmk.....	90
4.	Inducción de estrés proteotóxico por AAF-cmk .....	92
5.	Efecto de AAF-cmk sobre autofagia .....	94
6.	Posible sinergia entre AAF-cmk e inhibidores de PI3K.....	99
7.	Consideraciones finales .....	100
<b><u>CONCLUSIONES</u></b> .....		103
<b><u>BIBLIOGRAFÍA</u></b> .....		107
<b><u>ANEXO I: RESULTADOS OBTENIDOS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS</u></b>		
<b><u>ANEXO II: PUBLICACIONES</u></b>		



# **INTRODUCCIÓN**



## **INTRODUCCIÓN**

Las proteínas son biomoléculas formadas por cadenas lineales de aminoácidos que desempeñan un papel fundamental para la vida. Los niveles intracelulares de las proteínas se encuentran en un equilibrio dinámico gracias al balance entre los procesos de síntesis y de degradación.

En las células eucariotas las proteínas citosólicas y nucleares se degradan principalmente por dos vías: la vía ubiquitina-proteasoma (UPS) y la vía lisosomal (Ciechanover, 2012).

### **1. Vía ubiquitina-proteasoma**

La vía UPS constituye un mecanismo esencial de control basado en la degradación dependiente de ubiquitina (Ub) de las proteínas de las células. El proteasoma es la proteasa responsable de la degradación final de los sustratos de esta vía.

#### **1.1. El proteasoma**

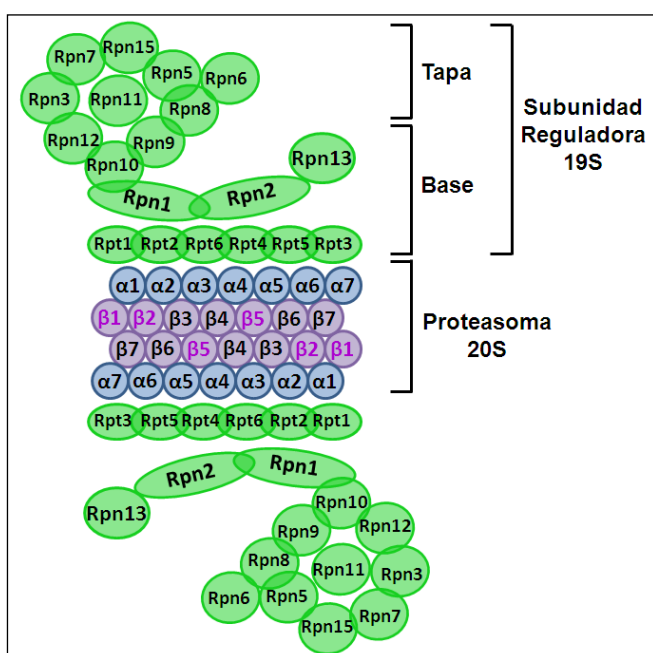
El proteasoma es un complejo multienzimático con actividad proteolítica que se encuentra tanto en el citosol como en el núcleo de todas las células eucariotas. Está formado principalmente por dos subcomplejos: el proteasoma 20S o núcleo catalítico y la subunidad 19S o complejo regulador (Peters et al., 1994).

##### **1.1.1. Proteasoma 20S**

Se trata de un complejo multicatalítico con una estructura cuaternaria muy conservada en forma de barril constituido por cuatro anillos, cada uno formado a su vez por siete subunidades. Tanto los anillos del centro como los de los extremos son iguales entre sí formando una estructura  $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$  respecto a un eje vertical. Las dimensiones aproximadas del cilindro son de 15 nm de altura y 12 nm de diámetro. En el centro de los anillos existe un poro de apertura regulada de aproximadamente 1,3 nm por el que los sustratos acceden a la cavidad catalítica, situada en el centro del complejo, para ser degradados (Lowe et al., 1995; Groll et al., 1997; Unno et al., 2002). Las subunidades  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_5$  son las que poseen los grupos activos y, aunque comparten un mecanismo catalítico común donde la treonina es el residuo catalítico esencial

(Fenteany et al., 1995; Arendt and Hochstrasser, 1997), presentan tres tipos de actividades proteolíticas distintas: actividad tríptica, que hidroliza uniones peptídicas tras residuos básicos, actividad quimotríptica, que hidroliza tras residuos hidrofóbicos y actividad caspasa, que lo hace tras residuos ácidos (Rivett, 1993).

El proteasoma 20S sólo es capaz de degradar proteínas o péptidos que estén totalmente desplegados, por lo que son necesarios otros componentes reguladores para la degradación de las proteínas intracelulares (Wenzel and Baumeister, 1995).



*Figura 1.* Estructura del proteasoma.

### 1.1.2. Subunidad reguladora 19S

El complejo regulador 19S se une a los extremos del proteasoma 20S constituyendo el proteasoma 26S (una sola subunidad 19S) o 30S (dos subunidades). Consta de al menos 19 proteínas y se puede dividir en dos subcomplejos: la base, que se une directamente al proteasoma 20S, y la tapa (Larsen and Finley, 1997; Glickman et al., 1998a; Finley, 2009).

La base está compuesta por 10 proteínas (Rpt1–Rpt6, Rpn1, Rpn2, Rpn10 y Rpn13), 6 de las cuales presentan actividad ATPasa (Rpt1–Rpt6). Rpn10 y Rpn13, junto con otras proteínas que se unen de forma reversible al proteasoma como Rad23 y Dsk2, reconocen los sustratos ubiquitilados. Las ATPasas se encargan de desplegar los sustratos, y con la ayuda de Rpn1 y



Rpn2, abren el canal de entrada al interior de la subunidad 20S (Glickman et al., 1998b; Bar-Nun and Glickman, 2012).

La tapa está formada por 9 subunidades (Rpn3, Rpn5-Rpn9, Rpn11, Rpn12 y Sem1), ninguna de las cuales tiene actividad ATPasa. Se cree que su función principal está relacionada con la eliminación de la ubiquitina de los sustratos (Deveraux et al., 1994; Glickman and Maytal, 2002; Lee et al., 2011). Rpn11 junto con USP14 y UCH37/UHL5, que se unen de forma reversible a la subunidad 19S del proteasoma, son las ubiquitín-hidrolasas encargadas de la desubiquitilación de los sustratos. Mientras que Rpn11 elimina las unidades de ubiquitina desde la base de la cadena (Yao and Cohen, 2002; Verma et al., 2002), USP14 y UCH37/UHL5 lo hacen de forma gradual desde la parte más distal al sustrato (Lam et al., 1997; Hanna et al., 2006).

### **1.1.3. Inmunoproteasoma**

En respuesta a una exposición de las células a interferón- $\gamma$  se produce un cambio en las subunidades catalíticas ( $\beta$ 1i/LMP2,  $\beta$ 2i/MECL1 y  $\beta$ 5i/LMP7 rempazan a las subunidades estándar  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 y  $\beta$ 5) de los proteasomas recién sintetizados incorporando a las células una nueva isoforma del proteasoma denominada inmunoproteasoma (Groettrup et al., 1997; Griffin et al., 1998).

La función de los inmunoproteasomas se ha asociado principalmente al procesamiento y presentación de antígenos por las proteínas del Sistema Principal de Histocompatibilidad de clase I. Las nuevas subunidades catalíticas hacen que se alteren los patrones de corte de esta población de proteasomas promoviendo la formación de péptidos o ligandos que van a ser presentados por este tipo de moléculas (Strehl et al., 2005).

Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que este tipo de proteasomas está involucrado en muchas otras funciones, incluyendo la regulación de la proteostasis (Krüger and Klotzel, 2012; Ebstein et al., 2012).

La exposición a interferón- $\gamma$  induce, además del cambio de isoforma en los proteasomas, la producción de radicales libres de oxígeno. Teniendo en cuenta que las proteínas recién sintetizadas son particularmente sensibles al daño oxidativo (Medicherla and Goldberg, 2008), se va a promover la generación de proteínas dañadas que van a tener que ser degradadas. Los inmunoproteasomas constituyen un sistema de adaptación frente a este tipo de

---

estrés, dado que tienen una capacidad de degradación al menos dos veces más eficaz que la de los proteasomas constitutivos (Seifert et al., 2010; Krüger and Klotzel, 2012).

Se ha visto que otros tipos de estrés o enfermedades que resultan en un aumento de proteínas poliubiquitiladas son suficientes para inducir la formación de inmunoproteasomas, sugiriendo que este tipo de proteasomas es necesario para mantener la viabilidad celular en condiciones fisiológicamente adversas (Díaz-Hernández et al., 2003).

## **1.2. Reconocimiento de sustratos**

El proteasoma es responsable de la eliminación de proteínas sintetizadas con errores o mal plegadas y de la degradación de proteínas reguladoras cuya rápida desaparición, en un momento dado, es necesaria para el control del metabolismo celular. Su actividad es esencial para la supervivencia y proliferación celular (Groll and Huber, 2003; Pickart and Cohen, 2004).

Una fracción muy significativa de los sustratos del proteasoma proviene de los DRiPs. Los DRiPs o productos ribosomales defectivos, son proteínas degradadas cotraduccionalmente o inmediatamente después de la traducción, posiblemente como resultado de un mal plegamiento o una traducción defectuosa. Constituyen en torno al 30% de las proteínas recién sintetizadas (Schubert et al., 2000; Princiotta et al., 2003), y probablemente representan a casi todas las proteínas expresadas en una célula.

### **1.2.1. Ubicuitina**

Existen varias señales que permiten al proteasoma identificar los sustratos que deben degradarse, siendo la más conocida la ubiquitilación. La ubiquitina es una proteína pequeña de 76 aminoácidos que se encuentra en todas las células eucariotas y que debe su nombre a su amplia distribución. Está altamente conservada a lo largo de la evolución desde levaduras hasta humanos. Juega un papel importante en varios procesos celulares mediante modificación post-traducciona l de las proteínas a las que se une. La ubiquitina se sintetiza como un precursor de alto peso molecular, formado por varias unidades de ubiquitina o por una ubiquitina fusionada a una proteína ribosomal, que es procesado por la acción de ubiquitin-hidrolasas para generar la forma

activa (Kimura and Tanaka, 2010). El último aminoácido de la ubiquitina activa es una glicina, aminoácido por el cual se va a unir de forma covalente, formando un enlace isopeptídico con el grupo  $\epsilon$ -amino de una de las lisinas del sustrato (Hershko and Ciechanover, 1998). También se han identificado ubiquitilaciones a través del grupo  $\alpha$ -amino del extremo N-terminal de la proteína (Ciechanover and Ben Saadon, 2004), así como de grupos hidroxilo de serina o treonina (Wang et al., 2007), y grupos tiol (de Cys), (Cadwell and Coscoy, 2005).

### **1.2.2. Ubicuitilación**

El proceso de ubicuitilación de las proteínas se desarrolla en varias etapas. En él participan, fundamentalmente, tres enzimas: E1, E2 y E3.

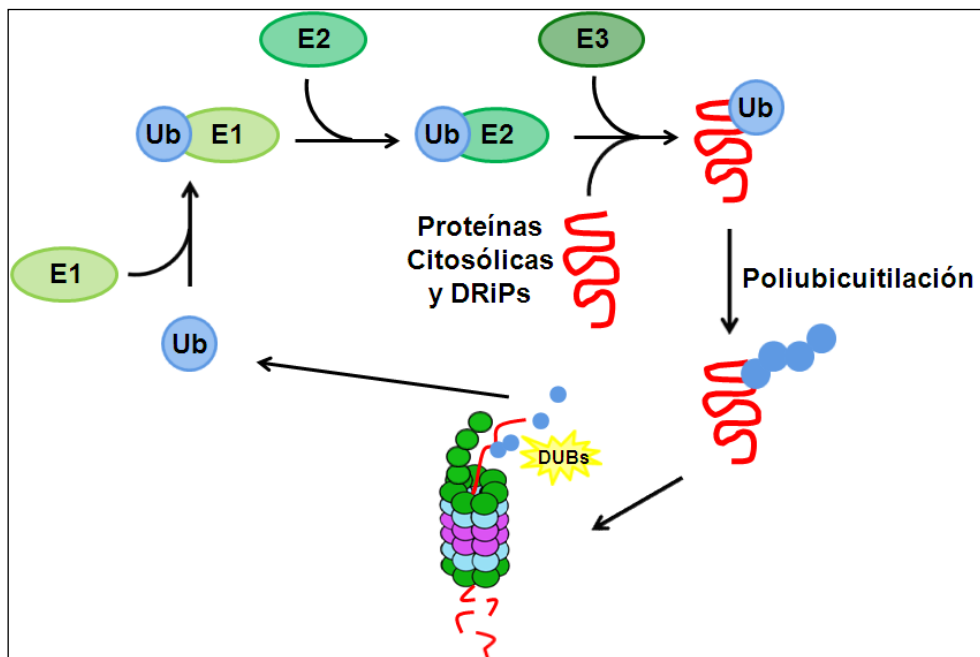
El primer paso es la formación, dependiente de ATP, de un enlace tioéster entre el C-terminal de la ubiquitina y el grupo tiol de una cisteína de la E1 (también llamada enzima activadora de ubiquitina) (Haas and Rose, 1982). A continuación, se produce la transferencia de la ubiquitina desde la E1 al grupo tiol de una cisteína de una E2 (denominada enzima de conjugación de ubiquitina). La tercera enzima, la E3 (ligasa de ubiquitina), tiene dos funciones; reconoce las proteínas diana, y facilita la transferencia de la ubiquitina activada desde la E2 hasta los residuos de lisina aceptores (Jentsch, 1992).

Curiosamente, las células poseen solamente dos enzimas E1, unas treinta enzimas E2, y más de seiscientas enzimas E3 que confieren la especificidad por los sustratos, lo que proporciona una gran versatilidad en su reconocimiento (Li et al., 2008).

El proceso de ubicuitilación se puede repetir (poliubicuitilación) o no (monoubicuitilación). Si se produce la poliubicuitilación, nuevas moléculas de ubiquitina se unen a la proteína ya modificada. La ubiquitina puede unirse a otros residuos de lisina de la proteína diana, y/o unirse a residuos de lisina de una ubiquitina unida anteriormente, formándose así largas colas de ubiquitina.

La ubiquitina tiene siete residuos de lisina (K6, K11, K27, K29, K33, K48 y K63) y un grupo amino en el N-terminal (M1) cada uno de los cuales puede, potencialmente, servir de anclaje al C-terminal de otra ubiquitina (Ikeda et al., 2010). Esto hace que se formen distintas topologías de cadenas, generando distintas señales para la célula. Así, la monoubicuitilación va a tener una

función reguladora, una cadena de al menos 4 ubiquitinas unidas por K48 (enlace más común) o K11 va a ser señal de degradación vía proteasoma 26S y una cadena de ubiquitinas unidas por enlaces K63 o M1 median procesos de señalización (Welchman et al., 2005). Las cadenas de poliubiquitina a través de K63 unen además adaptadores implicados en tráfico de proteínas y degradación proteolítica en lisosomas (Kirkin et al., 2009b).



**Figura 2.** Esquema de la vía UPS. Los sustratos que van a ser degradados por el proteasoma son ubiquitilados en un proceso secuencial en el que están involucradas 3 tipos de enzimas (E1, E2 y E3). Antes de ser procesadas por el proteasoma, las proteínas poliubiquitiladas se desubiquitilan manteniendo así los niveles de ubiquitina libre en la célula.

La ubiquitilación es un proceso reversible, existiendo cerca de un centenar de ubiquitín-hidrolasas en mamíferos que eliminan la ubiquitina de los sustratos, lo que constituye un sistema de regulación fundamental para las células (Fraile et al., 2012).

Aunque la degradación vía proteasoma es mayoritariamente de sustratos poliubiquitilados, los proteasomas también pueden degradar proteínas por un mecanismo independiente de ubiquitina (Jariel-Encontre et al., 2008).

## 2. Proteólisis lisosomal

Junto a los proteasomas, los lisosomas constituyen el otro gran sistema de degradación intracelular de proteínas. Durante muchos años a los lisosomas se les asignó la degradación general no selectiva. Sin embargo, no dejan de

aparecer pruebas que apoyan la existencia de mecanismos de degradación específica para esta vía proteolítica.

### **2.1. El lisosoma**

Los lisosomas son responsables de la degradación de proteínas intracelulares y proteínas extracelulares que son endocitadas. Son orgánulos de dimensiones variables que se caracterizan por tener un pH interno ácido (4,5-5), óptimo para la actividad de la mayoría de hidrolasas lisosomales. En su interior se han encontrado más de 40 tipos de enzimas que degradan proteínas, lípidos, sacáridos y nucleótidos (Luzio et al., 2007).

Las proteínas que son degradadas por los lisosomas pueden llegar a estos orgánulos por mecanismos diferentes en función de su localización celular, siendo la autofagia uno de estos mecanismos (Luzio et al., 2007).

### **2.2. Autofagia**

Aunque el término autofagia se utiliza normalmente para hablar de macroautofagia, hay que tener en cuenta que existen diversos tipos de autofagia en las células eucariotas:

- Microautofagia: la membrana del lisosoma forma pequeñas invaginaciones que se desprenden de la membrana y quedan en el interior del lisosoma, donde son degradadas. En estas invaginaciones se incorpora material citosólico (Sahu et al., 2011; Mijaljica et al., 2011).

- Autofagia mediada por chaperonas: proteínas citosólicas solubles con un motivo de secuencia peptídica específica (KFERQ) son reconocidas por un complejo de chaperonas moleculares que se unen al receptor LAMP-2A (proteína de membrana asociada al lisosoma de tipo 2A) en la membrana lisosomal por el que son translocadas hacia el interior del lisosoma para ser degradadas (Dice, 2007; Kon and Cuervo, 2010).

- Macroautofagia (a partir de ahora autofagia): consiste en el secuestro de grandes porciones de citoplasma (que pueden incluir orgánulos enteros) en vesículas de doble membrana y su posterior degradación lisosomal (Mizushima, 2007).

La autofagia es un proceso catabólico altamente conservado que resulta de la degradación lisosomal de los autofagosomas que envuelven contenido

---

citoplasmático. Es activa constitutivamente, si bien se hiperactiva en condiciones de ayuno, en procesos fisiológicos como el desarrollo y diferenciación o en procesos patológicos como enfermedades neurodegenerativas, infecciones y cáncer (Levine and Klionsky, 2004; Shintani and Klionsky, 2004; Huang and Klionsky, 2007; Mizushima et al., 2008).

### **2.2.1. Mecanismo**

El estudio de los genes implicados en la autofagia en levaduras ha permitido conocer el mecanismo molecular del proceso en el que se pueden distinguir varias etapas:

**1. Inducción:** existen varias vías implicadas en la iniciación y maduración de la autofagia, aunque quizás la más importante sea la de TOR (*Target Of Rapamycin*, mTOR en mamíferos). TOR es una serina/treonina quinasa que participa en la mayoría de las rutas de regulación que controlan la respuesta a los cambios en las condiciones de nutrientes y energía, ejerciendo un efecto inhibitorio sobre la autofagia (Noda and Ohsumi, 1998).

**2. Formación del autofagosoma:** comienza con la formación del fagóforo, una doble membrana en forma de “C” que se extiende por los dos extremos hasta cerrarse formando una vacuola denominada autofagosoma en cuyo interior se van a encontrar porciones de citoplasma y orgánulos (Weidberg et al., 2011).

Las proteínas implicadas en la formación de los autofagosomas se pueden dividir en dos grupos, que se caracterizan por ser dos sistemas de conjugación similares a la ubiquitinación (UBL), en los que Atg12 y Atg8 son los análogos a ubiquitina (Ohsumi, 2001; Xie and Klionsky, 2007).

El primer sistema de conjugación UBL consiste en la formación del complejo Atg12-Atg5. Atg12 es una proteína hidrofóbica pequeña (186 aminoácidos) que se une de forma covalente con su única diana Atg5. Inicialmente, Atg12 se une a Atg7 en un proceso dependiente de ATP. Atg7 funciona como una E1, formando un enlace tioéster entre su cisteína y la glicina C-terminal de Atg12. A continuación Atg12 se transfiere a la cisteína de Atg10, que actúa como una E2. Finalmente Atg12 forma un enlace isopeptídico con el grupo  $\epsilon$ -amino de la lisina 149 de Atg5. Hasta el momento no se conoce

a la E3 implicada en este proceso, aunque podría ser la propia Atg10 la encargada de conjugar a Atg12 y Atg5 directamente (Mizushima et al., 1998).

La formación del complejo Atg12-Atg5 es irreversible e indispensable para la formación del autofagosoma (Mizushima et al., 1998). El proceso se da de forma constitutiva nada más sintetizarse las proteínas, sin ser necesaria ninguna condición de inducción.

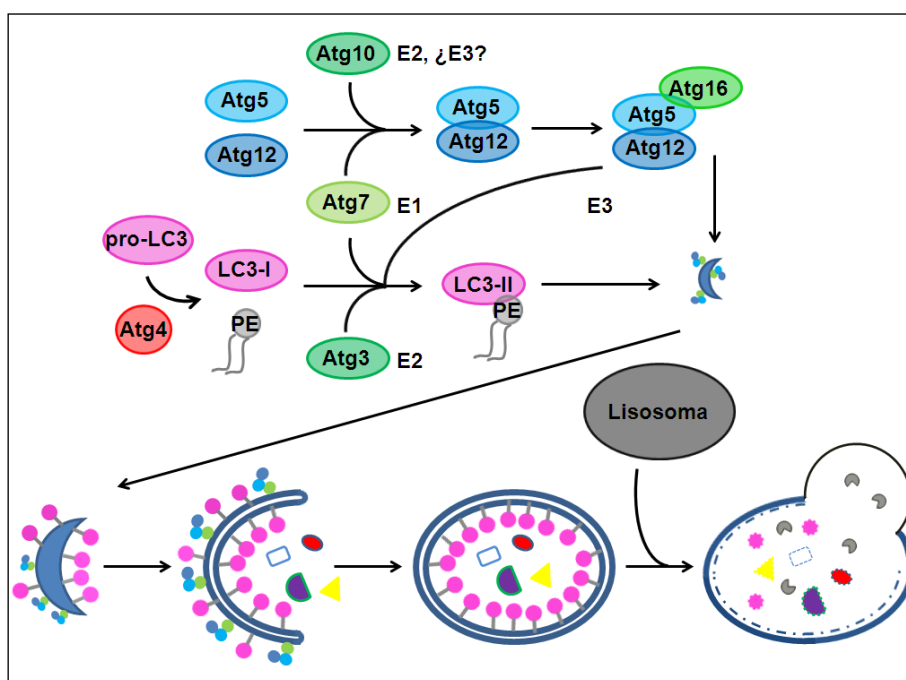
Para la elongación de la membrana es necesario que Atg16 (Atg16L en mamíferos) se una al complejo Atg12-Atg5 formando un nuevo complejo que se une a la pequeña vesícula en forma de "C" y se va distribuyendo de forma asimétrica según se va elongando la membrana, preferiblemente situándose en la parte convexa (Kuma et al., 2002). El complejo se disocia en el momento en que la membrana se cierra y se forma el autofagosoma (Mizushima et al., 2003).

El segundo sistema de conjugación lo constituye Atg8. Atg8 es una proteína ácida de 117 aminoácidos que tiene que ser procesada tras su síntesis. Atg4 es la encargada de eliminar un fragmento variable de la región C-terminal de la proteína, dejando expuesta una glicina (Kirisako et al., 2000). En mamíferos, existen 4 homólogos para Atg4: Atg4A, Atg4B, Atg4C y Atg4D (Autofaginas 2, 1, 3 y 4 respectivamente) (Mariño et al., 2003). Atg8 es entonces activada por la E1, Atg7, y posteriormente transferida a la E2, Atg3. En el paso final Atg8 no forma un complejo con otra proteína sino con un fosfolípido de membrana (fosfatidiletanolamina, PE), (Ichimura et al., 2000). La E3 encargada de esta reacción es el complejo Atg12-Atg5-Atg16 (Hanada et al., 2007). Las consecuencias de la lipidación de Atg8 son que pasa de ser soluble a ser componente integral de las membranas de los autofagosomas experimentando un cambio conformacional que favorecerá la unión a adaptadores y la fusión de membranas necesaria para el cierre del anisoma (Nakatogawa et al., 2007). Una vez completada la formación de los autofagosomas, las moléculas de Atg8 unidas a la membrana externa son recicladas, siendo Atg4 la enzima responsable de romper el enlace entre Atg8 y PE (Kirisako et al., 2000; Xie et al., 2008).

En mamíferos existen distintos ortólogos de Atg8: LC3A, LC3B, LC3C, GABARAP, GABARAP-L1, GABARAP-L2/GATE-16 y GABARAP-L3 (Shpilka et al., 2011). LC3 es el más estudiado y se utiliza como marcador de autofagia.

Todas estas proteínas, una vez activadas post-traduccionamente, pueden pasar de su forma citosólica (LC3-I) a la forma asociada a la membrana de los autofagosomas (LC3-II) (Kabeya et al., 2004).

**3. Fusión con lisosomas y degradación del contenido de los autofagosomas:** en mamíferos, este paso requiere una maduración del autofagosoma antes de que la fusión tenga lugar. Los autofagosomas se fusionan con endosomas, o vesículas derivadas de éstos, formando unas estructuras que se denominan anfisomas o vacuolas intermedias de autofagia que van a ser las que finalmente se fusionan con los lisosomas (Berg et al., 1998). Una vez completado este paso, el contenido de la vacuola se degrada permitiendo el reciclaje de macromoléculas que pueden ser utilizadas de nuevo por la célula, lo que hace que esta vía sea de una importancia crucial en condiciones de ayuno.



**Figura 3.** Esquema de la vía de autofagia. La formación de la doble membrana de los autofagosomas comienza con dos sistemas similares a la ubiquitinación en los que el papel de la ubiquitina lo desempeñan Atg12 y LC3 que se van a unir a Atg5 y a la PE respectivamente por medio de Atg7, Atg3 o Atg10 y el complejo Atg12-Atg5-Atg16 que actúan como enzimas E1, E2 y E3. Una vez formado el autofagosoma, este se fusiona con el lisosoma para la degradación del material que se encuentra en su interior.

### 2.2.2. Selección de sustratos

La autofagia se ha considerado como un sistema de degradación con muy poca o ninguna selectividad por sus sustratos. Sin embargo, existen evidencias



que apoyan la idea de que el proceso tiene especificidad por los sustratos que se van a degradar (Kirkin et al., 2009b; Kraft et al., 2010; Johansen and Lamark, 2011). La autofagia selectiva constituye un sistema de control de calidad importante, pudiendo ser inducida por distintos factores de estrés como el estrés oxidativo, infecciones, agregación de proteínas o la inhibición del proteasoma (He and Klionsky, 2009).

En la selección de sustratos juegan un papel importante las proteínas p62 y NBR1 (Bjorkoy et al., 2005; Kirkin et al., 2009a). Estas proteínas actúan como receptores de la autofagia interaccionando de forma directa con los sustratos que van a ser degradados y con las proteínas de la familia Atg8 asociadas a las membranas de los autofagosomas. Estos receptores son también degradados en este proceso (Johansen and Lamark, 2011).

p62 y NBR1 tienen una secuencia muy distinta pero comparten, no obstante, una estructura similar formada por un dominio PB1 (Phox y Bem 1) en el extremo N-terminal y un dominio UBA (UB-Associated) en el extremo C-terminal (Lamark et al., 2003). La interacción con los homólogos de Atg8 está mediada a través de un motivo de unión de 11 aminoácidos denominado LIR (LC3 Interacting Region) (Ichimura et al., 2008; Noda et al., 2008).

p62, a diferencia de NBR1, es una proteína que forma polímeros a través del dominio PB1. Estos polímeros son esenciales tanto para la formación de agregados de proteínas como para la degradación selectiva por autofagia (Lamark et al., 2003).

La presencia de p62 en agregados o cuerpos de inclusión (Pankiv et al., 2007), muchos relacionados con enfermedades humanas (Ju and Weihl, 2010), su acumulación cuando se inhibe la autofagia (Komatsu et al., 2007), y su capacidad de unirse a proteínas ubiquitiladas (Seibenhener et al., 2007) sugiere un modelo (Lamark and Johansen, 2012) en el que p62 primero se uniría a los sustratos ubiquitilados, posiblemente con una preferencia de unión a través de K63 de la ubiquitina aceptora, y a continuación formaría agregados al polimerizarse con otros complejos p62-sustrato, lo que generaría un cambio en su localización hacia el sitio de formación de los autofagosomas donde se incorporaría a ellos interaccionando con LC3 a través del motivo LIR.

También se ha visto que p62 puede estar implicado en la autofagia selectiva de sustratos no ubiquitilados (Gal et al., 2009; Orvedahl et al., 2010;

---

Watanabe and Tanaka, 2011), aunque en la mayoría de los casos la ubiquitilación de los sustratos parece ser importante, sirviendo como una etiqueta de reconocimiento para p62 (Komatsu et al., 2007; Nezis et al., 2008).

Por otra parte, el papel que desempeña NBR1 en la autofagia selectiva es menos conocido, se sabe, que al igual que p62, NBR1 tiene una mayor afinidad por unirse a sustratos poliubiquitilados a través de K63. La selección de sustratos la puede llevar a cabo en solitario, o interaccionando con p62 a través del dominio PB1 o las proteínas poliubiquitiladas. Es necesario para formación de agregados y se encuentra presente en cuerpos de inclusión relacionados con enfermedades humanas (Kirkin et al., 2009a).

### **3. Proteostasis y estrés proteotóxico**

La proteostasis es un término acuñado en 2008 y que hace referencia a todos los procesos que controlan y mantienen el proteoma celular. El término incluye desde la síntesis de las proteínas, su correcto plegamiento y tráfico y su degradación (Balch et al., 2008). Sus integrantes principales son las chaperonas moleculares y la vía UPS y es un sistema ajustable, a través de procesos de transcripción y traducción, a las necesidades determinadas por el tipo celular o por las condiciones de estrés a las que se enfrente una célula.

Las chaperonas son las encargadas de mantener la estructura correcta para cada proteína ayudando en el proceso de plegamiento y ensamblaje en complejos, así como decidiendo el destino de las proteínas que están mal plegadas o se han traducido con errores. De esta forma, las chaperonas van a decidir si una proteína mal plegada tiene que volverse a plegar o por el contrario ha de ser ubiquitilada para ser degradada por el proteasoma (Morimoto, 2008).

Cuando la célula está bajo una situación de estrés, se produce un aumento en la concentración de proteínas mal plegadas que si no se soluciona, puede acabar en una acumulación anormal de éstas, frecuentemente poliubiquitiladas, que eventualmente pueden llevar a la muerte celular.

En las células existen diferentes mecanismos de defensa frente a este tipo de condiciones adversas, que van a variar en función la fuente de estrés, del compartimento celular implicado, de las características de las proteínas afectadas (tendencia o no a la agregación, efecto sobre proteínas con las que

forme complejos, etc.) y del tipo celular afectado (Powers et al., 2009). Así existe una respuesta de choque térmico, fundamentalmente citosólica, una respuesta de estrés de retículo endoplasmático o una respuesta de estrés oxidativo, cada una de las cuales implica sensores y mediadores propios. Las diferentes fuentes de estrés llevarán a la activación de una o más de estas vías. En un primer momento se produce un aumento en la síntesis tanto de las chaperonas citosólicas como las de retículo que van a intentar solventar el problema plegando de nuevo las proteínas mal plegadas o mandándolas a degradación. En caso de que el daño persista y la célula no pueda soportar el exceso de material para degradar que llega al proteasoma, se pasa de un mecanismo de defensa a uno de muerte celular programada (Morimoto, 2011).

Cuando las proteínas forman agregados éstos suelen acumularse alrededor del centrosoma en estructuras denominadas agresomas (García-Mata et al., 2002). En estas estructuras se pueden encontrar, además de proteínas ubiquitiladas, proteasomas y chaperonas moleculares (Johnston et al., 1998; Antón et al., 1999; García-Mata et al., 1999; Wigley et al., 1999). Se caracterizan por depender del transporte retrógrado por microtúbulos (Johnston et al., 1998), se basan en la dineína (García-Mata et al., 1999) y la histona deacetilasa 6 (Kawaguchi et al., 2003) como adaptadores, y requieren la síntesis continua de proteínas. Este último es un punto crítico que puede explicarse con la hipótesis de los DRiPs, según la cual la inhibición de la síntesis de proteínas resulta en una drástica reducción en la cantidad de sustratos de la vía UPS.

#### **4. Vías proteolíticas alternativas al proteasoma: La TPPII**

La tripeptidil peptidasa II (TPPII) es una serín proteasa con actividad tanto aminopeptidasa (exopeptidasas) como endopeptidasa, esta última aún poco caracterizada (Geier et al., 1999; Tomkinson and Lindås, 2005). En cuanto a su actividad aminopeptidasa la TPPII hidroliza aminoácidos de tres en tres a partir del extremo N-terminal de sus oligopeptidos diana, característica que le da su nombre (Tomkinson, 1999).

Su estructura, al menos en *Drosophila*, está formada por un macrocomplejo de 6 MDa formado por dos hebras de 60 nm de longitud

---

enrolladas entre sí, constituidas cada una de ellas por 10 dímeros (Rockel et al., 2005).

La TPPII juega un papel crítico en el recorte de productos del proteasoma, particularmente aquellos péptidos mayores de 15 aminoácidos que sólo podrían ser degradados *in vivo* por esta peptidasa (Reits et al., 2004).

Existen varias evidencias que sugieren a la TPPII como proteasa candidata en una vía proteolítica alternativa al proteasoma (Antón and Villasevil, 2008). Cuando se inhibe el proteasoma, a corto plazo se produce una acumulación de proteínas poliubiquitiladas y un arresto en el ciclo celular que finalmente lleva a la muerte de la mayoría de las células. Eventualmente, una parte de las células pueden “adaptarse” a esta situación induciendo otras actividades proteolíticas que podrían reemplazar al proteasoma en alguna de sus funciones (Glas et al., 1998). Este grupo observó que estas células “adaptadas” mostraban un incremento de una actividad enzimática sensible a AAF-cmk (Ala-Ala-Phe-clorometilcetona), un análogo de sustrato que alquila el centro activo de las serín proteasas. Posteriormente, este incremento de actividad fue atribuido a TPPII (Geier et al., 1999).

En 2001 se demostró que no era necesario seleccionar las células con inhibidores del proteasoma para obtener células con características similares: las células del linfoma de Burkitt presentan baja actividad del proteasoma y un aumento en los niveles y actividad de TPPII, en comparación con las líneas linfoblastoides transformadas con el virus de Epstein-Barr (Gavioli et al., 2001).

Si bien estos datos sugieren que TPPII podría estar reemplazando al proteasoma, estudios posteriores demostraron la existencia de una actividad residual del proteasoma en las células seleccionadas con los inhibidores utilizados en los primeros estudios (Princiotta et al., 2001).

## **5. AAF-cmk**

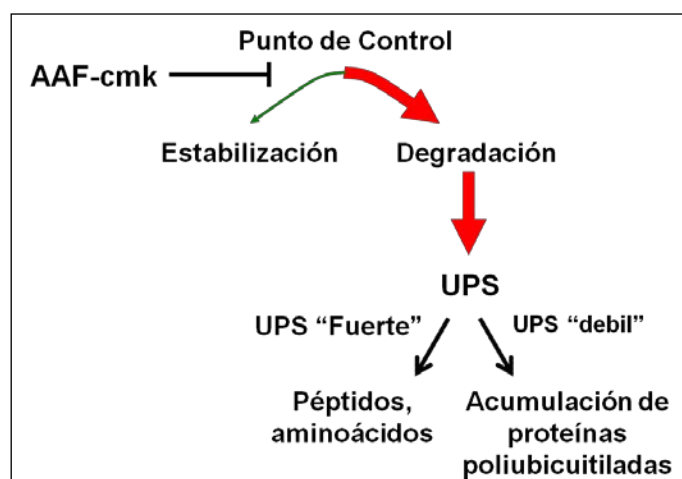
AAF-cmk es un inhibidor de serín proteasas que bloquea completamente la actividad de la TPPII (Geier et al., 1999).

El tratamiento con este inhibidor produce una acumulación de proteínas poliubiquitiladas en estructuras denominadas agresomas, dependiente del tipo celular (dos líneas de osteosarcoma y una del linfoma de Burkitt). Estos agresomas son muy similares a los que se forman en respuesta a tratamientos

con inhibidores del proteasoma, si bien la distribución citosol-núcleo de los sustratos ubiquitilados no es la misma con ambos inhibidores; al inhibir el proteasoma se produce un cambio en la distribución de núcleo a citosol que no se observa con AAF-cmk (Villasevil et al., 2010).

Teniendo en cuenta que el inhibidor no afecta a la actividad del proteasoma, el candidato más probable sería la TPPII. Sin embargo, los resultados obtenidos con un inhibidor más específico de la aminopeptidasa, como es la butabindida, o el silenciamiento de su expresión mediante siRNA, parecen excluir que su inhibición sea responsable de la acumulación de proteínas poliubiquitiladas (Villasevil et al., 2010).

Los resultados obtenidos en experimentos con inhibidores de proteasoma y AAF-cmk en ausencia o presencia de cicloheximida (inhibidor de la síntesis de proteínas) sugieren que ambos inhibidores estarían afectando a la vía UPS (Villasevil et al., 2010). De esta forma, el mecanismo de acción que propusimos en el laboratorio (Figura 4) sugiere que AAF-cmk estaría actuando sobre uno o varios reguladores de la estabilidad de sustratos de la vía UPS, siendo su efecto un aumento del flujo de estos sustratos hacia degradación, lo que resultaría en la saturación de una vía ya sobrecargada.



**Figura 4.** Modelo de acción de AAF-cmk.

Por lo tanto, la diana (o dianas) de AAF-cmk podría(n) estar actuando en una etapa anterior al proteasoma, bien ayudando a mantener el correcto plegamiento de sus sustratos o controlando el destino de éstos hacia la vía UPS. Ejemplos de cualquiera de estos casos son las chaperonas, como Hsp90 (Young et al., 2001) y Hsp70 (Höhfeld et al., 2001), cochaperonas como CHIP

---

(Connell et al., 2001), o sistemas de regulación de la ubiquitilación y desubiquitilación como los presentes en la subunidad reguladora del proteasoma (Crosas et al., 2006) o en el complejo p97 (Rumpf and Jentsch, 2006). Todos estos ejemplos constituyen sistemas donde se decide el destino de los clientes y sustratos de las dianas: plegamiento correcto vs mal plegamiento, estabilización vs degradación, y desubiquitilación vs ubiquitilación, favoreciendo el tratamiento con AAF-cmk la segunda de estas posibilidades.

## **6. Ubicuitín-hidrolasas**

Las ubicuitín-hidrolasas (DUBs, *DeUBiquitylating enzymes*) constituyen un gran grupo de proteasas responsables del procesamiento de los precursores sintéticos para generar los monómeros de ubiquitina y de la eliminación específica de la ubiquitina de los sustratos modificados, hidrolizando el enlace entre el carboxilo del último residuo de glicina de la ubiquitina y el grupo modificado en el sustrato. Tienen dos funciones principales: mantener los niveles de ubiquitina libre y modificar la estabilidad, función o tráfico del sustrato ubiquitilado (Ciechanover y Glickman, 2002). Pueden presentar especificidad de sustrato y sus efectos dependen de la función de la ubiquitilación que contrarresten, constituyendo un sistema de regulación de la homeostasis celular.

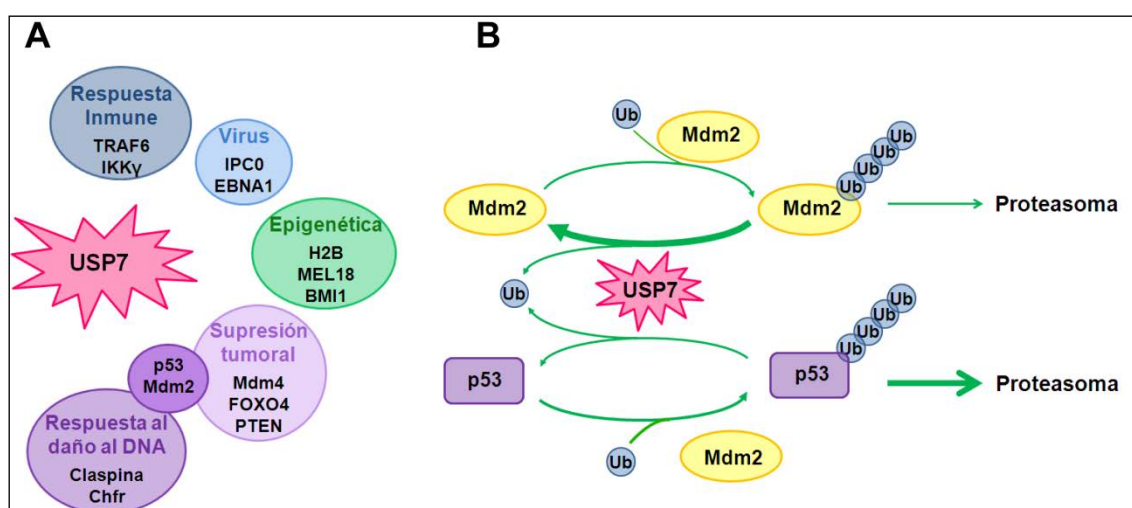
El genoma humano codifica unas 95 DUBs que pueden clasificarse en seis familias, cinco de las cuales corresponden a cistein proteasas: proteasas específicas de ubiquitina (USPs), hidrolasas de ubiquitina en el extremo C-terminal (UCHs), proteínas de la enfermedad de Machado-Joseph (MJD), proteasas relacionadas con tumor de ovario (OTU) y las relacionadas con la proteína inducida por la quimiocina MCP-1 (MCPIP). La última subfamilia corresponde a las metaloproteasas con motivos JAMM (Fraile et al., 2012; Nijman et al., 2005).

Debido a su actividad proteasa y a su implicación en varias enfermedades humanas, están teniendo un papel importante en la búsqueda de dianas farmacológicas que afectan a la vía de la ubiquitina. Dos ejemplos de esta búsqueda lo constituyen las enzimas USP7 y USP14, para las que se han descrito inhibidores específicos recientemente, con aplicación potencial en

cáncer o en enfermedades neurodegenerativas, respectivamente (Colland et al., 2009; Lee et al., 2010; Reverdy et al., 2012).

- La proteasa específica de ubiquitina 7 (USP7 o HAUSP) fue inicialmente identificada como DUB que interacciona con la proteína viral ICP0 en células infectadas con el virus de herpes simple tipo I (Everett et al., 1997). Posteriormente se han identificado numerosos sustratos asociados a la enzima que juegan un papel crucial en la supresión tumoral, reparación del DNA, replicación viral o control epigenético (Nicholson and Kumar, 2011) (Figura 5A).

Una de las rutas mejor caracterizada es la vía de p53 (Figura 5B). Los niveles celulares de p53 están controlados por la ubiquitin ligasa E3 Mdm2 que marca a p53 para su degradación por el proteasoma. Resulta destacable el hecho de que Mdm2 es a su vez su propio sustrato, llevando su autoubicuitilación a su degradación por el proteasoma. USP7 es la DUB encargada de desubicultilar ambas proteínas; en condiciones basales, muestra una mayor afinidad por Mdm2 (Hu et al., 2006); sin embargo, bajo ciertas condiciones tales como daño en el DNA, Mdm2 se inactiva y p53 se acumula, dando lugar a la transcripción de muchos de sus sustratos entre los que se encuentra el propio Mdm2.



**Figura 5.** USP7. (A) Algunos de los sustratos conocidos de USP7. Figura elaborada a partir de la de Nicholson y Kumar (2011); (B) Esquema de la función de USP7 en la vía de p53.

La ausencia total de USP7 conlleva una acumulación de p53, mientras que cuando se reducen los niveles de la enzima de una manera intermedia p53 puede disminuir (Li et al., 2002; Li et al., 2004; Cummins and Vogelstein, 2004). En el caso de una inhibición de USP7 los resultados obtenidos son algo

---

diferentes, puesto que siempre se consigue un aumento en los niveles de p53 independientemente del grado de inhibición alcanzado con la dosis del inhibidor que se utilice (Colland et al., 2009; Reverdy et al., 2012; Chauhan et al., 2012).

- USP14 es una de las DUBs asociadas al proteasoma (Leggett et al., 2002). Se han descrito dos tipos de actividad para esta enzima: una actividad catalítica que mantiene los niveles de ubiquitina libre en la célula mediante la desubiquitilación de los sustratos que llegan al proteasoma y una actividad no catalítica que inhibiría al proteasoma de forma dependiente de sustrato (Hanna et al., 2006). Se ha visto que además USP14 puede estar regulando la apertura del canal de acceso al proteasoma 20S (Peth et al., 2009), involucrando de este modo a USP14 en la regulación de la degradación por la vía UPS.

Uno de los escenarios posibles al inhibir este tipo de enzimas es la de desviar el equilibrio de estabilidad de varios sustratos hacia una mayor degradación, lo que puede provocar, en células en las que las vías proteolíticas están próximas a la sobrecarga, una saturación de las mismas.

Teniendo en cuenta tanto esta circunstancia como el hecho de que la actividad ubiquitín-hidrolasa también parece estar inducida en las células con baja actividad de proteasoma, las DUBs son un buen candidato como dianas de AAF-cmk.



## **OBJETIVOS**



**OBJETIVOS**

El objetivo de esta Tesis ha consistido en la identificación de sustratos de AAF-cmk que puedan explicar, al menos parcialmente, el efecto proteotóxico que ejerce sobre algunos tipos celulares, en particular aquéllos con una actividad comprometida de la UPS, y entender así mejor qué mecanismos son esenciales para la supervivencia celular en estas condiciones. Los objetivos concretos han sido:

- Identificación de dianas potencialmente relevantes del inhibidor AAF-cmk.
- Análisis del efecto de AAF-cmk sobre la actividad enzimática de dichas dianas.
- Análisis del efecto sobre las células de la inhibición de cada una de las dianas.
- Análisis del efecto de AAF-cmk sobre la fisiología celular, evaluando el estrés proteotóxico.
- Análisis del efecto de AAF-cmk sobre la vía de autofagia.
- Análisis del efecto del inhibidor sobre el ciclo celular y la viabilidad.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**



## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1. Líneas celulares, condiciones de cultivo y tratamiento con inhibidores**

Las líneas celulares utilizadas en este trabajo se describen en la Tabla 1. Todas ellas se crecieron en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado con 10% de suero bovino fetal, previamente inactivado durante 30 minutos a 56 °C, y L-glutamina 2 mM, en una atmósfera controlada a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>.

**Tabla 1. Líneas celulares**

Línea	Especie	Tejido	Transfectantes
143B-TK <sup>-</sup>	<i>Homo sapiens</i>	Osteosarcoma	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Atg4B</li> <li>• Atg4B<sup>C74A</sup></li> <li>• mCherry-EGFP-LC3B</li> <li>• CHOP-Luciferasa</li> <li>• ShAtg4B</li> <li>• ShCo</li> <li>• ShUSP14</li> <li>• USP14</li> <li>• YFP-LC3B</li> </ul>
CV-1	<i>Cercopithecus aethiops</i>	Riñón	
HCT116	<i>Homo sapiens</i>	Carcinoma colorrectal	
*HCT116 p53 <sup>-/-</sup>	<i>Homo sapiens</i>	Carcinoma colorrectal	
*HCT116 USP7 <sup>-/-</sup>	<i>Homo sapiens</i>	Carcinoma colorrectal	
HeLa	<i>Homo sapiens</i>	Adenocarcinoma de cérvix	
HEK 293T	<i>Homo sapiens</i>	Embrionario de riñón	
U-2 OS	<i>Homo sapiens</i>	Osteosarcoma	<ul style="list-style-type: none"> <li>• mCherry-EGFP-LC3B</li> <li>• mCherry-EGFP-LC3B ΔC</li> <li>• CHOP-Luciferasa</li> </ul>

\* Líneas cedidas por el Dr. Bert Vogelstein, *Johns Hopkins University*, Baltimore (Bunz et al., 1998; Cummins et al., 2004).

---

El tratamiento de las células se llevó a cabo a 37 °C, iniciándose con la adición de medio de cultivo fresco en presencia o ausencia del inhibidor, o mezcla de inhibidores.

Los inhibidores utilizados en este trabajo fueron:

- 17-alilamino-17-demetoxigeldanamicina (17-AAG), un análogo de la geldanamicina que bloquea de forma específica la actividad de Hsp90 (1 µM, Sigma. Stock 8,5 mM en DMSO).
- Ala-Ala-Phe-clorometilcetona (AAF-cmk), un inhibidor de serín-proteasas que bloquea de forma irreversible la actividad de TPPII (concentración final variable dependiendo de cada experimento, Biomol. Stock 110 mM en DMSO).
- Bafilomicina, inhibidor de la ATPasa de H<sup>+</sup> vacuolar. Bloquea la actividad de las hidrolasas del lisosoma al aumentar el pH de su interior (0,2 µM, Sigma. Stock 160 µM en DMSO).
- Cicloheximida (CHX), inhibidor de la síntesis de proteínas (200 µM, Sigma. Stock 35,5 mM en agua).
- Epoxomicina, un inhibidor selectivo e irreversible del proteasoma (1 µM, Calbiochem o Sigma. Stock 1,8 mM en DMSO).
- LY294002, inhibidor de la fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K, 20 µM, Calbiochem. Stock 1 mg/ml en DMSO).
- MG-132, un inhibidor reversible del proteasoma, no específico, pudiendo inhibir otras actividades como las calpaínas (20 µM, Biomol o Sigma. Stock 21 mM en DMSO).
- Tunicamicina, inhibidor de la glicosilación de proteínas que induce una respuesta de estrés de retículo (concentración final variable dependiendo de cada experimento, Sigma. Stock 1 µg/µl en DMSO).

Todos los stocks de inhibidores se almacenaron a -20°C.

Otros reactivos utilizados fueron:

- HA-LC3-VS, sonda acoplada a hemaglutinina que se une de forma covalente a Atg4 (0,125 µg, BostonBiochem. Stock 0,62 µg/µl) (Hemelaar et al., 2003).
- HA-Ub-VS, sonda similar a la anterior que inhibe la mayoría de ubiquitín-hidrolasas (1 µg, BostonBiochem. Stock 1 µg/µl en agua) (Borodovsky et al., 2002).



- LC3-amc, sustrato fluorogénico utilizado para medir la actividad enzimática de Atg4B (0,25  $\mu$ M, BostonBiochem. Stock 0,38  $\mu$ g/ $\mu$ l).
- Ub-amc, sustrato fluorogénico utilizado para medir la actividad enzimática de ubiquitín-hidrolasas (0,5  $\mu$ M, BostonBiochem. Stock 2,2  $\mu$ g/ $\mu$ l).

Todos los reactivos se almacenaron a -70°C.

## 2. Técnicas de DNA

### 2.1. Plásmidos o construcciones

- pBluescript: vector comercial (Invitrogen).
- pcDNA3-Mdm2: vector que codifica la proteína Mdm2 (cedido por el Dr. Manuel Rodríguez, Inbiomed, San Sebastián)
- pcDNA3.1-USP14: vector que codifica la proteína USP14 de ratón (cedido por el Dr. Daniel Finley, *Harvard Medical School*) (Lee et al., 2010).
- pCep-pu-Atg4B: vector que codifica la proteína Atg4B humana con un epítipo de poli-His en el extremo C terminal. Originalmente el plásmido está diseñado para la secreción extracelular de la construcción insertada aunque se ha modificado eliminando la secuencia señal de modo que la proteína expresada se produce intracelularmente, (cedido por los Drs. Carlos López-Otín y Guillermo Mariño, Universidad de Oviedo) (Mariño et al., 2003).
- pCI-USP7 catalíticamente activo e inactivo: vectores que codifican la proteína USP7 humana catalíticamente activa e inactiva (cedido por el Dr. Roger Everett, *Medical Research Council*, Glasgow) (Canning et al., 2004).
- pDest-mCherry-EGFP-LC3B: vector que codifica la proteína LC3B humana marcada doblemente con la etiqueta mCherry-EGFP (cedido por el Dr. Terje Johansen, *Institute of Medical Biology*, Universidad de Tromsø) (Pankiv et al., 2007).
- pEYFP-C1: vector comercial que permite clonar proteínas fusionándolas al extremo C-terminal de EYFP (Clontech).
- pXP2-CHOP: vector que codifica la luciferasa bajo el control del promotor de la proteína de estrés de retículo CHOP (cedido por la Dra. M<sup>a</sup> Jesús Bullido, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa) (Martínez García, 2007).

---

### 2.1.1. Vectores lentivirales

- pCMVdR: vector que codifica los genes estructurales de los lentivirus (cedido por el Dr. Ricardo Gargini, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa).
- pLKO.1 scramble (ShCo): vector lentiviral comercial que permite la expresión de un shRNA sin especificidad (plásmido 1864, Addgene).
- pMD2G: vector que codifica la proteína G de la envuelta del virus de la estomatitis vesicular (cedido por el Dr. Ricardo Gargini, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa).
- ShAtg4B: vector lentiviral comercial que permite la expresión de un shRNA contra la secuencia de la proteína Atg4B (TRCN0000073802, Sigma).
- ShUSP7: vector lentiviral comercial que permite la expresión de un shRNA contra la secuencia de la proteína USP7 (TRCN0000004058, Sigma).
- ShUSP14: vector lentiviral comercial que permite la expresión de un shRNA contra la secuencia de la proteína USP14 (TRCN0000007428, Sigma).

### 2.2. Purificación de DNA plasmídico

Los plásmidos se obtuvieron a partir de cultivos de bacterias competentes *E. coli*. DH5 $\alpha$  (invitrogen). La purificación se realizó mediante cromatografía de intercambio aniónico, utilizando el sistema “*Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System*” de Promega para la purificación a pequeña escala, o el sistema “*QUIAGEN® Plasmid Purification*” de QUIAGEN en el caso de una purificación a gran escala. El DNA obtenido se cuantificó en un espectrofotómetro nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific).

### 2.3. Clonajes

Los clonajes se llevaron a cabo con enzimas de restricción de Promega o New England BioLabs siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los oligos utilizados se describen en la Tabla 2.

Las ligaciones se llevaron a cabo con la T4 DNA ligasa de Promega. Con el objetivo de evitar la religación de los vectores, en algunos casos se fosforilaron los extremos 5' de los vectores con la quinasa “*T4 Polynucleotide Kinase*” y se desfosforilaron los extremos 3' de los insertos utilizando la fosfatasa alcalina ambas de Promega siguiendo en ambos casos las instrucciones del fabricante.

La separación de los fragmentos de DNA se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,9% en presencia de bromuro de etidio (0,2 µl/ml). En el caso de que fuera necesario purificar a partir de geles, el DNA se purificó mediante el sistema “*Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System*” de Promega.

En todos los casos la secuencia final se comprobó mediante secuenciación en el Parque Científico de Madrid.

**Tabla 2. Oligos**

Oligo	Diana	Secuencia
LA089	LC3B	ACTGGAAGCTTCGCGCACCATGCCGTCGGAGAAG
LA090	LC3B	AGCACGGATCCTTACACTGACAATTTCA
LA097	Etiquetado USP7	CTAGAATGGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAAT ATGCATACCGGTCATCATCACCATCACCATG
LA098	Etiquetado USP7	TCGACATGGTGATGGTGATGATGACCGGTATGCATATTCA GATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTTCATT
LA117	Mutagénesis Atg4B	CACAGGCTGGGGCGCCATGCTGCGGTGTGG
LA118	Mutagénesis Atg4B	CCACACCGCAGCATGGCGCCCCAGCCTGTG
LA119	Etiquetado USP14	CACCATGGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATA TGCATACCGGTCATCATCACCATCACCATGCG
LA120	Etiquetado USP14	GATCCGCATGGTGATGGTGATGATGACCGGTATGCATATT CAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTTCATGGTGGTAC
LA130	LC3B	TACCGAATTCATGCCGTCGGAGAAGACC
LA132	LC3B	TAGATGGATCCTCGACTTACCCGAACGTCTCC

### 2.3.1. Etiquetado y cambio de vector USP7

Con el objetivo de añadir una etiqueta a las construcciones de USP7, se llevaron a cabo varios pasos de clonaje.

Por un lado, se digirió el plásmido pCI-USP7 catalíticamente activo con las enzimas de restricción *Xba*I y *Sa*I. El etiquetado de la proteína se llevó a cabo mediante la hibridación de los oligos LA097 y LA098, que contienen una secuencia para la etiqueta Myc-His (MEQKLISEEDLNMHTGHHHHHHV), y su posterior ligación con el vector digerido. El etiquetado se confirmó mediante

---

digestión con la enzima de restricción *Agel* que lineariza el plásmido sólo en el caso de que haya habido ligación.

Este protocolo no se pudo seguir en el caso del plásmido con la proteína catalíticamente inactiva, USP7<sup>C223S</sup>, ya que éste carecía del sitio de restricción *Sall*. En este caso la aproximación que se siguió fue la siguiente: se digirieron los plásmidos pCI-Myc-His USP7 y pCI-USP7<sup>C223S</sup> con la enzima de restricción *SacII*. Esta enzima genera un fragmento que contiene la mutación en la posición 223, lo que permitió cambiarla de plásmido mediante una ligación. El clonaje se confirmó mediante digestión con la enzima de restricción *SpeI*, generando un fragmento de 1667 bp en caso de obtener la orientación correcta del inserto.

Con el objetivo de facilitar la transfección de células con estas construcciones, decidimos cambiarlas al vector pcDNA3.1. Para ello, se digirieron los plásmidos pcDNA3.1, pCI-Myc-His USP7 y pCI-Myc-His USP7<sup>C223S</sup> con las enzimas de restricción *NotI* y *KpnI*. Las digestiones dobles de las construcciones de USP7 generaron tres fragmentos, uno de los cuales, de 3537 bp, contenía la secuencia de USP7. Se ligaron vector e insertos y se comprobó la ligación mediante digestión con las enzimas de restricción *NotI* y *KpnI*.

### **2.3.2. Etiquetado de USP14**

El etiquetado de la construcción de USP14, se realizó de una forma muy similar al realizado para el plásmido pCI-USP7 catalíticamente activo. En este caso, el plásmido pcDNA3.1-USP14 se digirió con las enzimas de restricción *BamHI* y *KpnI* y el etiquetado con Myc-His (MEQKLISEEDLNMTGHHHHHHV) se realizó mediante la hibridación de los oligos LA119 y LA120. Como en el caso anterior, la ligación fue comprobada por digestión con la enzima de restricción *Agel*.

### **2.3.3. Clonaje de la secuencia de LC3B en el vector pEYFP-C1**

El fragmento de DNA correspondiente a LC3B se obtuvo a partir de cDNA de células 143B-TK<sup>-</sup> obtenido previamente en el laboratorio. El DNA se amplificó mediante PCR con la DNA polimerasa kOD (Novagen) y los oligos LA089 y LA090 siguiendo las instrucciones del fabricante de la polimerasa.

A continuación, se digirieron tanto el DNA amplificado como el plásmido pEYFP-C1 con las enzimas de restricción *HindIII* y *BamHI*. Se ligaron los dos fragmentos y se comprobó la ligación mediante digestión con una de las dos enzimas de restricción.

#### 2.3.4. Construcción mCherry-EGFP-LC3B procesado ( $\Delta C$ )

Con el objetivo de generar una construcción en la que la proteína LC3B se sintetizara sin la necesidad de ser procesada por Atg4, se amplificó LC3B a partir de la construcción mCherry-EGFP-LC3B, añadiendo un codón de terminación después del correspondiente a la Gly<sup>120</sup> de LC3B, utilizando los oligos LA130 y LA132. La secuencia se amplificó con la DNA polimerasa KOD, siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, se digirieron tanto el DNA amplificado como el plásmido pDest-mCherry-EGFP-LC3B con las enzimas de restricción *BamHI* y *EcoRI*. Se ligaron vector e inserto y se comprobó la ligación mediante digestión con las mismas enzimas de restricción.

#### 2.3.5. Generación de Atg4B<sup>C74A</sup> por mutagénesis dirigida

Debido a que el plásmido en el que se encuentra la construcción de Atg4B es muy grande, previamente a la mutagénesis se clonó el cDNA en un plásmido más pequeño (pBluescript), utilizando las enzimas de restricción *XhoI* y *KpnI*.

La mutagénesis dirigida se llevó a cabo mediante una reacción de PCR utilizando como DNA polimerasa la enzima KOD y los oligos LA117 y LA118 siguiendo las instrucciones del fabricante de la polimerasa. Al finalizar la PCR se añadió la enzima *DpnI* para eliminar los restos del DNA parental y se precipitó el DNA amplificado con etanol y acetato sódico. La presencia de la mutación se confirmó digiriendo con la enzima de restricción *NarI* que genera un fragmento de 300 bp como resultado del nuevo sitio de corte que produce el cambio de nucleótidos.

La secuencia del mutante se pasó de nuevo al vector pCep-pu mediante digestión con las enzimas de restricción *XhoI* y *KpnI* y posterior ligación del inserto con el vector.

---

## 2.4. Transfecciones

Las transfecciones, tanto transitorias como estables, se realizaron con células a una confluencia superior al 60% mediante uno de los siguientes métodos:

### 2.4.1. *Lipofectamine<sup>TM</sup> Reagent-Plus<sup>TM</sup> Reagent* (Invitrogen)

Este reactivo se utilizó para la producción de partículas lentivirales en células HEK 293T. Las células se transfectaron en frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> con 8 µg del plásmido lentiviral de interés, 4 µg del plásmido pCMVdR y 4 µg del plásmido pMD2.G. Por un lado, se añadieron 36 µl del reactivo “*Lipofectamine<sup>TM</sup> Reagent*” a 750 µl de medio sin suero (*Opti-MEM<sup>®</sup> I Reduced Serum Medium*) y por otro los plásmidos y 24 µl del reactivo “*Plus<sup>TM</sup> Reagent*” a la misma cantidad de medio. Siguiendo las instrucciones del fabricante, se mezclaron e incubaron las soluciones y se añadieron a las células.

### 2.4.2. *NanoJuice<sup>TM</sup> Transfection Kit* (Novagen)

Para el resto de transfecciones se utilizó este reactivo. Las células se transfectaron siguiendo el protocolo del fabricante siendo la relación “*NanoJuice Core Transfection Reagent*”-“*NanoJuice Transfection Booster*”-DNA utilizada para una placa de 12 pocillos 0,5 µl-0,5 µl-0,5 µg.

Los transfectantes estables se consiguieron añadiendo el antibiótico de selección 24 horas tras la transfección (en la mayoría de los casos con la adición de Geneticina (350 µg/ml, G418 de Gibco, Invitrogen) al medio de cultivo y un posterior clonaje mediante dilución límite. Todos los transfectantes se analizaron bien por citometría de flujo o mediante Western Blot (WB) dependiendo de las características de la construcción utilizada.

## 2.5. Silenciamiento génico: producción y transducción de vectores lentivirales.

La producción de las partículas lentivirales se llevó a cabo transfectando las células según se indica en el apartado 2.4.1. Al día siguiente, se retiró el medio y se añadieron 12 ml de medio completo fresco. 48-72 horas tras la transfección se recogió el medio, se filtró con un filtro de 45 µm y se hicieron

alícuotas de 2 ml que se congelaron a -70 °C hasta el momento de la transducción.

La transducción se llevó a cabo en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> añadiendo al medio de cultivo una alícuota del lentivirus correspondiente. Para favorecer la adsorción del virus a las células se añadió polybreno (8 µg/ml, Sigma. Stock 4 mg/ml en PBS). Al día siguiente, se seleccionaron las células transducidas añadiendo puromicina (1 µg/ml, Sigma. Stock 1 mg/ml en agua) al medio.

El silenciamiento de la expresión de la proteína de interés se confirmó mediante WB.

### **3. Técnicas de proteínas**

#### **3.1. Western Blot**

Los precipitados de células se lisaron en tampón de lisis (1% SDS, 50 mM Tris-HCl, 40 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, pH 7,6) suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas (*Complete Mini*, Roche), durante 15 minutos a 95 °C. Tras centrifugar 15 minutos para eliminar los restos celulares, se cuantificó la cantidad de proteína total de los lisados mediante el sistema *Dc Protein Assay* (Bio-Rad) siguiendo el protocolo del fabricante y se normalizó la cantidad de proteínas en las muestras.

En los casos en los que era necesaria una separación del material soluble e insoluble, las muestras se lisaron en un tampón de lisis con Triton X-100 (2% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,4) suplementado con la mezcla de inhibidores de proteasas, durante 10 minutos en hielo. Los lisados se centrifugaron y se continuó procesando las muestras con el sobrenadante y el precipitado por separado.

Las muestras se hirvieron durante 5 minutos en tampón de carga (125 mM Tris-HCl, 10% β-mercaptoetanol, 20% glicerol, 4% SDS, 5% azul de bromofenol, pH 6,8) y se procesaron mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida a distintas concentraciones (90-100 V, aproximadamente 1 hora).

Tras la electroforesis los geles de poliacrilamida se transfirieron a membranas de nitrocelulosa Hybond ECL (0,45 µm, GE Healthcare) durante toda la noche a 20 V y a 4 °C (sistema húmedo Bio-Rad).

**Tabla 3. Anticuerpos primarios para WB**

<b>Antígeno</b>	<b>Peso molecular (kDa)</b>	<b>Especie</b>	<b>Dilución</b>	<b>Casa comercial (referencia)</b>
Atg4B	45	Policlonal conejo	1/500	Sigma (A2981)
GRK2	80	Policlonal conejo	1/500	Santa Cruz Biotechnology (sc-562)
HA	Variable	Monoclonal ratón	1/5.000	Hibridoma clon 12CA5
HSP70	70	Policlonal conejo	1/20.000	StressGen (SPA-812)
LC3B	16/18	Policlonal conejo	1/1.000	Sigma (L7543)
Mdm2	90	Policlonal conejo	1/200	Santa Cruz Biotechnology (sc-813)
NBR1	107	Monoclonal ratón	1/200	Santa Cruz Biotechnology (sc-130380)
p21	21	Policlonal conejo	1/500	Santa Cruz Biotechnology (sc-397)
p53	53	Monoclonal ratón	1/1.000	Santa Cruz Biotechnology (DOI-1)
p62	62	Policlonal cobaya	1/1.000	ProGen (GP62-C)
PARP1	116/85	Monoclonal ratón	1/2.500	Sigma (P248)
PERK	140	Policlonal conejo	1/1.000	Cell Signaling (3192)
phospho-eIF2alpha	38	Policlonal conejo	1/500	Cell Signaling (9721)
$\gamma$ -Tubulina	50	Policlonal conejo	1/10.000	Sigma (T3320)
Ubicuitina *	Variable	Policlonal conejo	1/200	Sigma (U5379)
USP7	130	Policlonal conejo	1/10.000	Calbiochem (DR1014)
USP10	110	Policlonal conejo	1/2.000	Sigma (U7384)
USP11	110	Policlonal cabra	1/500	Sigma (SAB2501089)
USP14	60	Monoclonal ratón	1/500	Santa Cruz Biotechnology (sc-100630)
USP15	110	Policlonal conejo	1/500	GeneTex (GTX104644)

\* Las membranas que se revelaron con anti-Ubicuitina se hirvieron en agua destilada durante 30 minutos antes de incubarlas con el tampón de bloqueo.



A la mañana siguiente, las membranas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en tampón de bloqueo (5% leche en PBS-Tween-20, 0,1%, PBS-T). A continuación, se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente diluido en el tampón de bloqueo a la concentración indicada en la Tabla 3. Tras tres lavados con tampón de bloqueo, las membranas se incubaron otra hora con el anticuerpo secundario apropiado conjugado a peroxidasa (1/10.000, SouthernBiotech). Las membranas se lavaron con tampón de lavado (PBS-T) y las proteínas se visualizaron por quimioluminiscencia con el sistema ECL de GE Healthcare revelando las membranas en películas de autorradiografía (Agfa). En los casos en los que era necesaria una cuantificación de las proteínas, la imagen se obtuvo además con el equipo ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) utilizando el software ImageQuantTL para su cuantificación.

En algunos casos, se eliminaron los anticuerpos de las membranas con 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 100 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 2% SDS, durante 30 minutos a 50 °C. Las membranas se lavaron dos veces con PBS-T y a continuación se bloquearon e incubaron con los anticuerpos correspondientes.

Con el objetivo de revelar dos anticuerpos diferentes simultáneamente, se utilizó una variante del WB utilizando anticuerpos secundarios acoplados a fluorocromos con longitudes de onda de excitación de 680 o 800 (LI-COR Biosciences). En este caso, las membranas se visualizaron con el sistema de imagen de infrarrojos Odyssey (LI-COR Biosciences).

### **3.2. Inmunoprecipitación**

Las células se lisaron con tampón de lisis (0.5% Igepal CA-630, 50mM Tris-HCl, 5mM  $MgCl_2$ , pH 7,4) suplementado con la mezcla de inhibidores de proteasas durante 30 minutos a 4 °C en agitación continua. Después de centrifugar 10 minutos para eliminar el material insoluble, los lisados se incubaron con anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a sefarosa (eBioscience) durante 30 minutos a 4 °C para bloquear las uniones inespecíficas. Para preparar la matriz de afinidad se incubó, en paralelo, la sefarosa-anti-IgG con el anticuerpo de interés.

---

La inmunoprecipitación se realizó durante 2 horas a 4 °C en agitación continua. Los inmunoprecipitados se lavaron tres veces con tampón de lisis, y se procesaron según el experimento realizado.

### **3.3. Purificación por bolitas de agarosa de níquel (Ni-NTA)**

Los precipitados de células se lisaron con tampón de lisis (10 mM Imidazol, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 0,5% Tween-20, pH 8) durante 30 minutos a 4 °C en agitación continua. Tras una centrifugación a 9000 x g durante 10 minutos, se añadieron 25 µl de bolitas de agarosa Ni-NTA (Quiagen) previamente equilibradas en el tampón de lisis. Las muestras se incubaron 2 horas a 4 °C en agitación continua. Tras la incubación, se lavaron las bolitas de agarosa Ni-NTA tres veces con tampón de lavado (20 mM Imidazol, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, pH 8) y se procesaron por WB.

### **3.4. Identificación de proteínas por espectrometría de masas**

Las muestras se procesaron por SDS-PAGE y el gel de poliacrilamida se fijó en metanol:ácido acético (10%:7%) durante una hora. El gel se procesó en el Servicio de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB, Madrid) donde se tiñó con Sypro Ruby y se cortaron, de forma manual, las bandas de interés. Tras la digestión triptica, se procedió al análisis de las muestras por MALDI-TOF/TOF (espectrómetro de masas ABi 4800 MALDI TOF/TOF, Applied Biosystems). La identificación de proteínas se llevó a cabo con la herramienta de búsqueda MASCOT (v.2.1, Matrix Science) utilizando la base de datos no redundante de proteínas NCBI.

## **4. Ensayos de actividad enzimática**

### **4.1. Identificación de dianas de AAF-cmk: Vinil sulfonas**

Con el objetivo de identificar posibles dianas de AAF-cmk se lisaron  $1,5 \times 10^6$  células con 50 µl de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 250 mM sacarosa, 1 mM DTT, 1 mM ATP, pH 7,4) y bolitas de vidrio ≤106 µm (1 volumen de bolitas de vidrio por 2 volúmenes de tampón de lisis) durante 1 minuto en el vortex. Tras centrifugar durante 6 minutos a 800 x g para eliminar núcleos y membranas, se recogieron 20 µl del sobrenadante y se añadió la sonda HA-X-VS, donde X es, dependiendo del experimento,

ubiquitina o LC3. Tras una incubación de 1 hora a 37 °C se añadió tampón de carga y se procesaron las muestras para análisis por WB.

#### **4.2. Ensayos de actividad enzimática mediante hidrólisis de sustratos fluorogénicos**

Los ensayos de actividad enzimática se llevaron a cabo a partir de inmunoprecipitados de la proteína a estudiar mediante el análisis de la hidrólisis de un sustrato fluorogénico X-7-amido-4-metilcumarina (X-amc). La medición se llevó a cabo en placas de 96 pocillos en un fluorímetro (FLUOstar OPTIMA, BMG labtech) que permite la monitorización continua de la fluorescencia (longitud de onda de excitación de 370nm y longitud de onda de emisión de 430nm) cada 15 segundos a una temperatura prefijada (30 °C). Los resultados se procesaron con el programa Microsoft Office Excel 2007.

#### **4.3. Ensayo de desubicultilación de Mdm2 *in vitro***

Las traducciones *in vitro* tanto de Mdm2 con de USP7 se realizaron con 1 µg de plásmido con el kit de transcripción/traducción “*TNT® T7 Quick Coupled Transcription/Translation System*” (Promega) en presencia o ausencia de metionina-<sup>35</sup>S respectivamente, siguiendo las instrucciones del fabricante. La ubiquitilación de Mdm2 se llevó a cabo en un tampón que contiene un sistema de regeneración de ATP (50 mM Tris pH 7,6, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM NaCl, 2 mM ATP, 10 mM de fosfato de creatina (Sigma), 3,5 U/ml de creatina quinasa (Sigma), y 0,6 U/ml de pirofosfatasa inorgánica (Sigma)), ubiquitina (10 mg, Sigma), E1 (50 ng, Enzo) y E2 (50 ng, Enzo). La reacción de ubiquitilación se realizó durante 2 horas a 30 °C. A continuación se procedió con el experimento de desubicultilación añadiendo a la reacción USP7 activo o inactivo previamente tratado en presencia o ausencia de AAF-cmk (150 µM) durante 1 hora a 37 °C. Tras una hora de incubación a 30 °C, se paró la reacción añadiendo tampón de carga de electroforesis. Las muestras se resolvieron por SDS-PAGE en geles de acrilamida que se secaron y se visualizaron mediante autorradiografía.

---

#### **4.4. Medida de la actividad transcripcional con gen indicador de luciferasa**

Los ensayos se llevaron a cabo en transfectantes transitorios 48 horas después de la transfección. Tras un tratamiento con 100  $\mu$ M de AAF-cmk o 2,5  $\mu$ g/ml de tunicamicina durante 18 horas, se lisaron  $5 \times 10^5$  células en 100  $\mu$ l de tampón de lisis "*Cell Culture Lysis Reagent*" (Promega) según las instrucciones del fabricante. Para medir la actividad luciferasa se utilizó el kit "*Luciferase Assay System*" (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante con la variable de que se utilizaron 40  $\mu$ l de los lisados en vez de 20  $\mu$ l. La emisión de luminiscencia se midió en un luminómetro (SIRIUS, BERTHOLD DETECTION SYSTEMS).

### **5. Otras técnicas**

#### **5.1. Citometría de flujo**

Las células se fijaron en paraformaldehído (PFA, Electron Microscopy Sciences) al 1% en PBS y la fluorescencia se midió directamente en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences) utilizando el software CellQuest™ Pro versión 4.0.2 (BD Biosciences). Los datos se analizaron mediante el programa FlowJo 7.2.2.

#### **5.2. Microscopía confocal**

En los experimentos de inmunofluorescencia para microscopía confocal se cultivaron  $4 \times 10^4$  células durante 24 horas sobre cubreobjetos circulares estériles de 12 mm de diámetro (Electron Microscopy Sciences, previamente tratados con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 20% y almacenados en etanol) depositados en placas de 24 pocillos. Tras los tratamientos de cada experimento, las células se lavaron 3 veces con PBS y se fijaron con PFA al 3% en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Con el fin de bloquear y eliminar el PFA, las células se lavaron 3 veces con glicina al 2% en PBS. Las células se permeabilizaron con 0,5% Triton x-100 (Sigma) en PBS suplementado con albúmina de suero bobino (BSA) al 0,1% durante 3 minutos en hielo. Tras tres lavados adicionales con PBS-BSA, las células se bloquearon durante una hora a 4 °C en suero de burro al 5% en PBS-BSA. A continuación, se procedió con la tinción de las células (en cámara húmeda y a temperatura ambiente). Las células se

incubaron con los anticuerpos primarios (Tabla 4.) durante 1 hora, se lavaron tres veces con PBS-BSA y se incubaron durante otra hora con los anticuerpos secundarios (Alexa, Invitrogen). Tras varios lavados con PBS, agua destilada y un lavado final con etanol, los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos de vidrio, utilizando Mowiol (Calbiochem) suplementado con 1,4-diazabicyclo-(2,2,2)-octano (DABCO, Sigma) al 2,5% previamente calentado a 37 °C durante 5 minutos como medio de montaje.

La adquisición de las imágenes se llevó a cabo en un microscopio de Barrido Láser confocal (LSM510) acoplado a un microscopio invertido (Axiovert200 M, Zeiss).

**Tabla 4. Anticuerpos primarios para Microscopía confocal**

Anticuerpo	Especie	Dilución	Casa comercial (referencia)
anti-LC3B	Policlonal conejo	1/100	Sigma (L7543)
anti-NBR1	Monoclonal ratón	1/100	Santa Cruz Biotechnology (sc-130380)
anti-p62	Policlonal cobaya	1/250	ProGen (GP62-C)
anti-poliUb(K <sup>63</sup> ) *	Monoclonal ratón	1/100	Biomol (PW0600)
FK2 **	Monoclonal ratón	1/1000	Biomol (PW8810)

\* Reconoce poliubiquitina anclada en Lys63

\*\* Reconoce proteínas mono- y poliubiquitiladas pero no ubiquitina libre

En el caso de los experimentos llevados a cabo con las construcciones de mCherry-EGFP-LC3B, en los que las células no se tiñeron con ningún anticuerpo, tras la fijación y lavados con PBS-glicina se procedió a lavar con PBS, agua y etanol y los cubreobjetos se montaron inmediatamente sobre portaobjetos de la misma forma que en el caso anterior.

Las imágenes se adquirieron en un microscopio de Barrido Láser confocal y multifotón LSM710 acoplado a un microscopio invertido (AxioObserver).

En todos los casos se utilizó el objetivo de inmersión 63X/1.4 *oil Plan-Apochromat* (Zeiss). Las imágenes adquiridas se procesaron con el programa ImageJ (NIH), montándose finalmente con los programas Adobe Illustrator y Photoshop CS2. Salvo en los casos que se especifica, las imágenes corresponden a un único plano en el eje Z. En algunos casos los

---

niveles de fluorescencia se corrigieron para mejorar la calidad de la imagen, siempre manteniendo la linealidad.

### **5.3. Microscopía electrónica**

Para el análisis por microscopía electrónica, se sembraron  $2 \times 10^6$  células 143B-TK<sup>-</sup> en placas P50 el día anterior al tratamiento. Tras la incubación en presencia o ausencia de AAF-cmk, se depositaron sobre hielo y se lavaron dos veces con PBS a 0°C; tras ello se incubaron con Proteinasa K (50 µg/ml, Calbiochem) en hielo durante unos 5 minutos, hasta observar que la monocapa se levanta sin que se pierda la integridad de ésta. Tras ello la enzima se inhibió con AEBSF (250 µg/ml, Fluka), se centrifugaron las monocapas a 800 x g a 4°C y las células se resuspendieron y se incubaron durante 70 minutos en 350 µl de solución de fijado (glutaraldehído al 2% en 250 mM HEPES). A continuación se centrifugaron a 800 x g, durante 5 minutos a temperatura ambiente y se lavaron tres veces con un tampón fosfato proporcionado por el Servicio de Microscopía Electrónica del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. El montaje en resina de las células, los cortes en micrótopo y la tinción con Ag se realizaron en dicho servicio. Las muestras se analizaron en un microscopio electrónico de transmisión JEM-1010 (Jeol).

### **5.4. Análisis del ciclo celular**

El análisis del ciclo celular se realizó mediante tinción con yoduro de propidio, un fluorocromo que se intercala en el DNA y RNA de doble cadena. Tras el tratamiento requerido en cada experimento, los precipitados celulares se resuspendieron en 300 µl de PBS. Se añadió etanol frío (-70 °C) hasta una concentración final de 70% y las muestras se incubaron toda la noche a 4 °C para permitir la fijación y la permeabilización de las células.

Al día siguiente, las células se lavaron en PBS 1X-BSA 1% para eliminar el etanol y se tiñeron en yoduro de propidio (10 µg/ml, Sigma) durante 1 hora a temperatura ambiente. La tinción se acompañó de RNAsa para eliminar el RNA (150 µg/ml, R4875 Sigma). Una vez teñidas, las muestras se analizaron por citometría de flujo midiendo la fluorescencia roja asociada al yoduro de propidio.

### 5.5. Cuantificación de autolisosomas con mCherry-EGFP-LC3B

Las células transfectadas de forma transitoria con la construcción mCherry-EGFP-LC3B se procesaron para microscopía confocal y las imágenes se tomaron como se indica en el apartado 5.2. La cuantificación de autolisosomas se realizó con el programa ImageJ, utilizando el Plug-In OBCOL (*Organelle Based CO-Localisation*), siguiendo las consideraciones sugeridas por los autores (Woodcroft et al., 2009). Previo al análisis se alinearon los planos de los colores rojo y verde para corregir el desplazamiento de ambos canales, utilizando para ello el Plug-in “*Align RGB Planes*”<sup>1</sup> para ImageJ y substrayendo el fondo con el Plug-In “*Rolling Ball Background*”<sup>2</sup>. Los datos generados por OBCOL se verificaron visualmente y se corrigieron y eliminaron artefactos, contabilizando como autolisosomas aquellos objetos sin fluorescencia en el canal verde, o con un valor de fluorescencia verde  $\leq 10\%$  de la fluorescencia roja.

---

<sup>1</sup> <http://www.dentistry.bham.ac.uk/landinig/software/software.html>

<sup>2</sup> <http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/rolling-ball.html>





## **RESULTADOS**



## **RESULTADOS**

### **1. La inhibición de Hsp90 induce la formación de agresomas pero no es diana de AAF-cmk**

Teniendo en cuenta el modelo de acción propuesto para AAF-cmk, el inhibidor estaría actuando en una fase previa al proteasoma, induciendo la degradación de sustratos que en condiciones basales son estables. En las células cuya actividad del proteasoma está comprometida, como las adaptadas a inhibidores del proteasoma o células del linfoma de Burkitt, esto podría saturar la vía UPS, resultando en la acumulación de al menos una fracción de esos sustratos. Esto es lo que podría estar ocurriendo en la línea celular de osteosarcoma 143B-TK<sup>-</sup> en la que habíamos detectado la acumulación de proteínas poliubiquitiladas en respuesta a AAF-cmk.

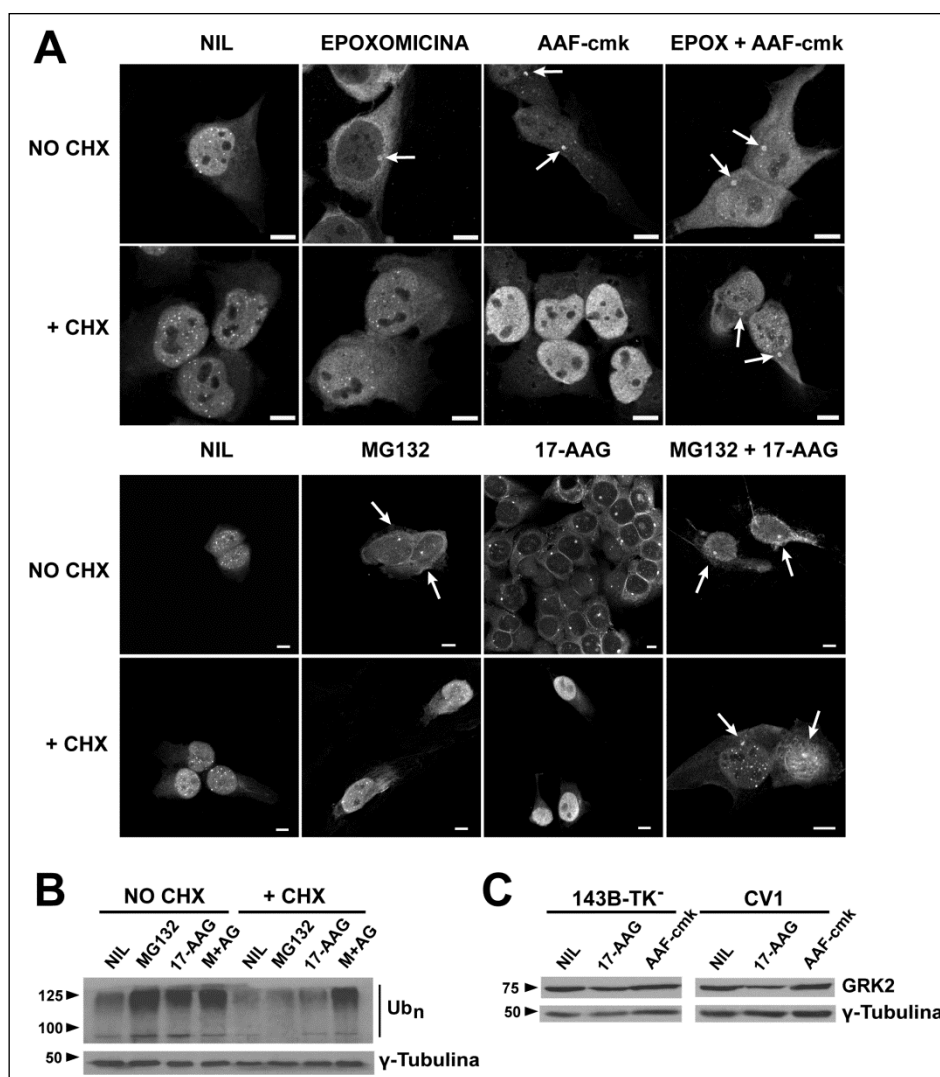
La chaperona Hsp90 es una proteína esencial muy abundante en todas las células eucariotas implicada en la homeostasis de proteínas (Taipale et al., 2010). La inhibición de esta chaperona lleva a la degradación de alguno de sus sustratos, un proceso que, al menos en parte, está mediado por la vía UPS (Pearl et al., 2008). Esto hace que Hsp90 sea un candidato potencial como diana de AAF-cmk.

Por tanto, lo primero que quisimos ver es si la inhibición de Hsp90 resultaba en una acumulación de proteínas poliubiquitiladas similar a la observada tras el tratamiento con AAF-cmk.

Para abordar esta posibilidad, se utilizó el inhibidor de Hsp90 17-alilamino-17-demetoxigeldanamicina (17-AAG), un análogo de la geldanamicina (Schulte and Neckers, 1998) que induce la formación de agresomas en células MCF10A que sobreexpresan la proteína sinfilina-1, implicada en la enfermedad de Parkinson (Geng and Klionsky, 2008).

En primer lugar, se analizó la distribución de proteínas poliubiquitiladas en células 143B-TK<sup>-</sup> tratadas durante cuatro horas con 70  $\mu$ M AAF-cmk, 1  $\mu$ M 17-AAG y/o inhibidores de proteasoma (1  $\mu$ M epoxomicina o 20  $\mu$ M MG132) por inmunofluorescencia, utilizando el anticuerpo monoclonal FK2, que reconoce proteínas mono- y poliubiquitiladas, pero no ubiquitina libre. Los resultados mostraron que, de forma similar a lo que ocurre con AAF-cmk, el 75% de las células tratadas con 17-AAG presentaban agresomas (Figura 6A).

Sin embargo, la distribución de los sustratos poliubiquitilados en las células era más similar a la obtenida con inhibidores del proteasoma que con AAF-cmk.



**Figura 6.** Efecto de la inhibición de la chaperona Hsp90 sobre la formación de agresomas y los niveles de GRK2. (A) Las células 143B-TK<sup>-</sup> se trataron con los distintos inhibidores (70  $\mu$ M AAF-cmk, 1  $\mu$ M 17-AAG, 1  $\mu$ M epoxomicina (EPOX), 20  $\mu$ M MG132) por separado o en combinación, y en presencia o ausencia de cicloheximida (CHX), durante 4 horas. A continuación las células se fijaron, permeabilizaron y tiñeron con el anticuerpo FK2. Las flechas señalan la posición de los agresomas y las barras corresponden a 10  $\mu$ m; (B) Análisis por WB de los lisados de células tratadas como en (A). M+AG indica el tratamiento combinado de MG132 y 17-AAG; (C) WB de lisados celulares de células 143B-TK<sup>-</sup> y CV1 tratadas durante 15 horas con 50  $\mu$ M AAF-cmk o 1  $\mu$ M 17-AAG. En (B) y (C) se muestra la  $\gamma$ -Tubulina como control de carga.

Teniendo en cuenta que la acumulación de proteínas poliubiquitiladas en respuesta a los tratamientos tanto con AAF-cmk como con inhibidores de proteasoma es dependiente de la síntesis continua de proteínas (Villasevil et al., 2010), nos planteamos analizar si ocurría lo mismo con 17-AAG. Los resultados obtenidos, utilizando tratamientos combinados con CHX, mostraron

una sensibilidad al inhibidor de síntesis de proteínas similar entre AAF-cmk y 17-AAG (Figura 6A). Cuando se inhibió la síntesis de proteínas la formación de agresomas sólo fue evidente en los tratamientos en los que se combinaron 17-AAG y MG132 (69% de las células), mientras que los inhibidores por separado no indujeron ninguna respuesta. Los resultados fueron confirmados por WB con anti-Ubiquitina (Figura 6B).

En resumen, tanto AAF-cmk como 17-AAG inducen la formación de agresomas en las células 143B-TK<sup>-</sup> mostrando una sensibilidad similar a CHX. Sin embargo, las diferencias en la distribución celular de los sustratos ubiquitilados deja abierta la cuestión de si Hsp90 es realmente una diana de AAF-cmk.

La quinasa 2 de receptores acoplados a proteínas G (GRK2) es un sustrato bien conocido de Hsp90 que se degrada por el proteasoma cuando la chaperona se inhibe con geldanamicina (Luo and Benovic, 2003).

Para confirmar o descartar a Hsp90 como diana de AAF-cmk, se analizó por WB el efecto del tratamiento con 50  $\mu$ M AAF-cmk o 1  $\mu$ M 17-AAG durante 15 horas sobre GRK2 tanto en las células 143B-TK<sup>-</sup> como en la línea resistente a AAF-cmk CV1. Los resultados mostraron una reducción significativa de los niveles de GRK2 en las células CV1 debido al tratamiento con 17-AAG y una reducción marginal pero consistente en las 143B-TK<sup>-</sup>. El tratamiento con AAF-cmk, por el contrario, no cambió los niveles del sustrato en ninguna de las dos líneas celulares (Figura 6C). Por tanto, si bien la inhibición de Hsp90 provoca una acumulación de proteínas poliubiquitiladas similar a la que induce AAF-cmk, esta chaperona no es una diana del inhibidor.

## **2. AAF-cmk inhibe algunas DUBs**

Como ya se ha mencionado en la introducción, igual que la TPPII, la actividad ubiquitín-hidrolasa parece estar inducida en las células con baja actividad del proteasoma. Además, la inhibición de estas enzimas podría desviar el equilibrio de estabilidad de varios sustratos hacia una mayor degradación, señalando a las DUBs como dianas potenciales de AAF-cmk.

Para identificar posibles candidatos se utilizó una sonda covalente que detecta las DUBs activas de tipo cisteín proteasa, consistente en la secuencia de ubiquitina precedida de una etiqueta de hemaglutinina (HA) y con un grupo

---

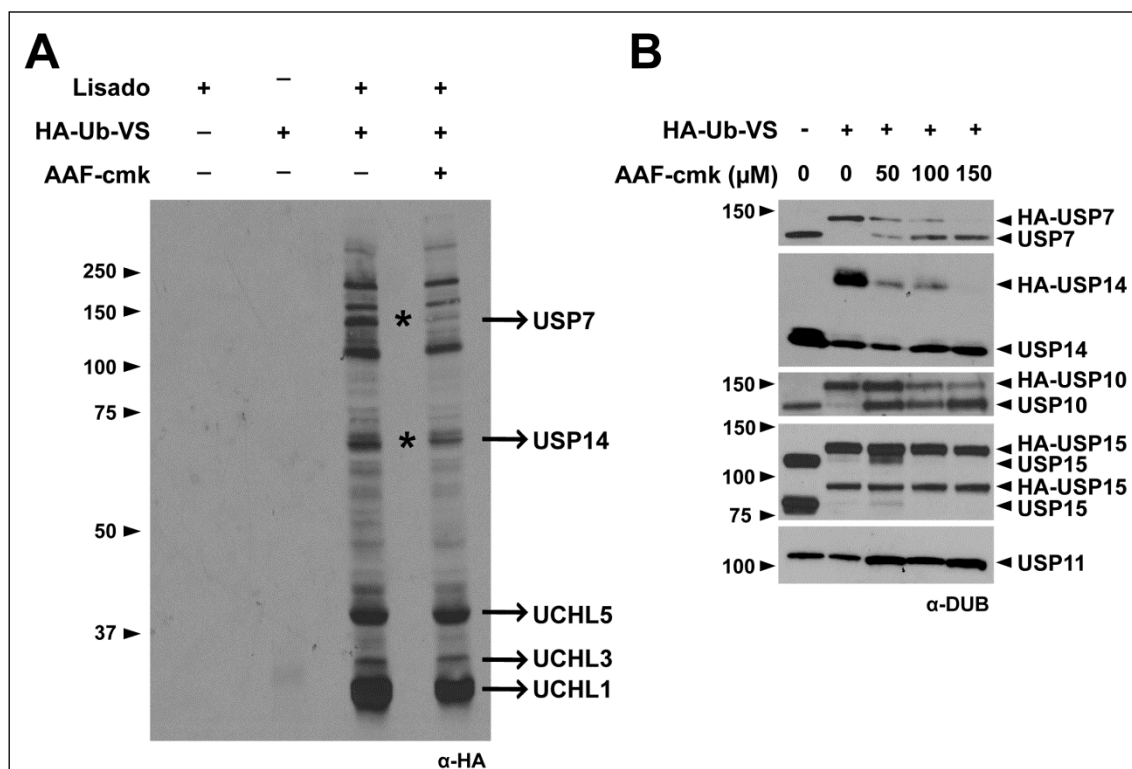
vinilsulfona en el carboxilo terminal (HA-Ub-VS). Esta sonda permite la formación de un enlace tioéter con el residuo Cys del grupo activo de las DUBs. Mediante un WB con anti-HA se obtiene un perfil de las DUBs activas en la célula. Tras el tratamiento previo con un inhibidor, en este caso AAF-cmk, desaparecerían aquellas bandas correspondientes a las DUBs que hubieran resultado inhibidas permitiendo identificar posibles dianas del inhibidor.

Para comprobar si alguna DUB se inhibe con AAF-cmk, se trató la línea celular 143B-TK<sup>-</sup> en presencia o ausencia de 50  $\mu$ M AAF-cmk durante dos horas y, posteriormente se incubaron los lisados celulares con la sonda HA-Ub-VS durante una hora a 37 °C. Las DUBs modificadas se visualizaron mediante WB con anti-HA. Se distinguieron dos zonas en las que la intensidad de las bandas se veía reducida en el carril correspondiente a las células previamente tratadas con AAF-cmk respecto al control; una alrededor de 150 kDa y otra sobre 70 kDa (Figura 7A).

Con la intención de caracterizar las proteínas que se podrían encontrar en esos rangos de tamaño, se repitió el experimento, inmunoprecipitando la muestra con anti-HA tras la incubación con la sonda. Las muestras se cargaron en un gel de acrilamida y se analizaron por MALDI-TOF.

Se identificaron varias DUBs entre las que se encontraron USP7, USP14, UCHL5, UCHL3 y UCHL1 (Figura S1 y Anexo I). Las bandas en las que se identificaron USP7 y USP14 correspondían a una movilidad electroforética similar a la de las bandas sensibles al tratamiento con AAF-cmk. Dado que el complejo formado entre la sonda y la DUB modificada se traduce en un aumento de tamaño en SDS-PAGE, se trataron las células con diferentes concentraciones de AAF-cmk (50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M y 150  $\mu$ M), los lisados se incubaron con HA-Ub-VS y el WB se reveló con distintos anticuerpos para analizar cambios en el patrón de bandas correspondientes a distintas DUBs. Se seleccionaron aquellas DUBs cuyo complejo con la sonda presentaría un peso molecular semejante a las bandas en las que se observó diferencias de intensidad en la Figura 7A. De esta manera confirmamos que tanto USP7 como USP14 se modifican por la sonda y que AAF-cmk impide esta modificación de forma dependiente de concentración, indicando que estas dos DUBs son dianas del inhibidor. De la misma manera, se observó que USP10 se inhibe de forma parcial y que USP15 no se inhibe en absoluto, ya que ninguna de las

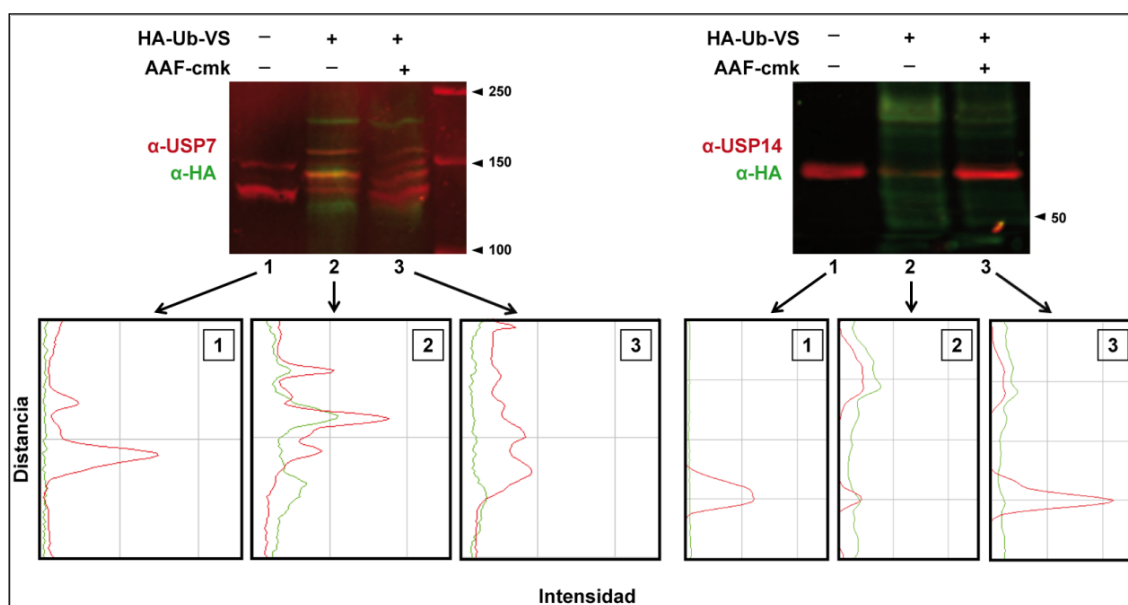
concentraciones de AAF-cmk utilizadas fue capaz de impedir la modificación por la sonda. Por su parte, USP11 no se modificó con la sonda por lo que no podría ser responsable de la disminución en intensidad de la banda de 150 kDa de interés (Figura 7B).



**Figura 7.** Identificación de DUBs como dianas potenciales de AAF-cmk. (A) Las células 143B-TK se incubaron con 50 μM AAF-cmk durante dos horas y, posteriormente se incubaron los lisados celulares con la sonda HA-Ub-VS durante una hora a 37 °C. Las DUBs modificadas se visualizaron mediante WB con anti-HA. Como controles se muestran el lisado sin ningún tratamiento y 1 μl de la sonda utilizada. Los asteriscos muestran las zonas en las que la intensidad de las bandas es menor en el carril correspondiente al tratamiento con AAF-cmk. Las DUBs que se indican con las flechas corresponden con las proteínas identificadas por espectrometría de masas; (B) Caracterización del efecto de AAF-cmk sobre algunas de las DUBs que se encuentran en las zonas señalizadas en (A). Las células se trataron igual que en (A) utilizando diferentes concentraciones de AAF-cmk (50 μM, 100 μM y 150 μM). El WB se reveló con diferentes anticuerpos frente a las DUBs analizadas.

A continuación quisimos comprobar que la inhibición de USP7 y USP14 era responsable de la disminución en las bandas de la Figura 7A. Para ello, se repitió el experimento tratando las células con 100 μM AAF-cmk y los resultados se analizaron por WB con anti-HA y con anti-USP7 o anti-USP14, utilizando anticuerpos secundarios marcados con fluorocromos diferentes y visualizando los resultados con el sistema de imagen de infrarrojos Odyssey. Los resultados, analizados con el programa ImageJ, confirmaron que las

bandas que disminuyen en las células tratadas con AAF-cmk contienen, en efecto, USP7 y USP14 respectivamente (Figura 8). No obstante, si bien en el caso de USP14 el descenso de intensidad que se observa con anti-HA tras tratamiento con AAF-cmk correlaciona con el descenso de intensidad de la enzima, no ocurre así con USP7, donde la banda con anti-HA desaparece casi completamente, mientras que aún queda una señal visible con anti-USP7, lo que sería compatible con la existencia de alguna otra enzima no identificada que diera cuenta de este descenso.



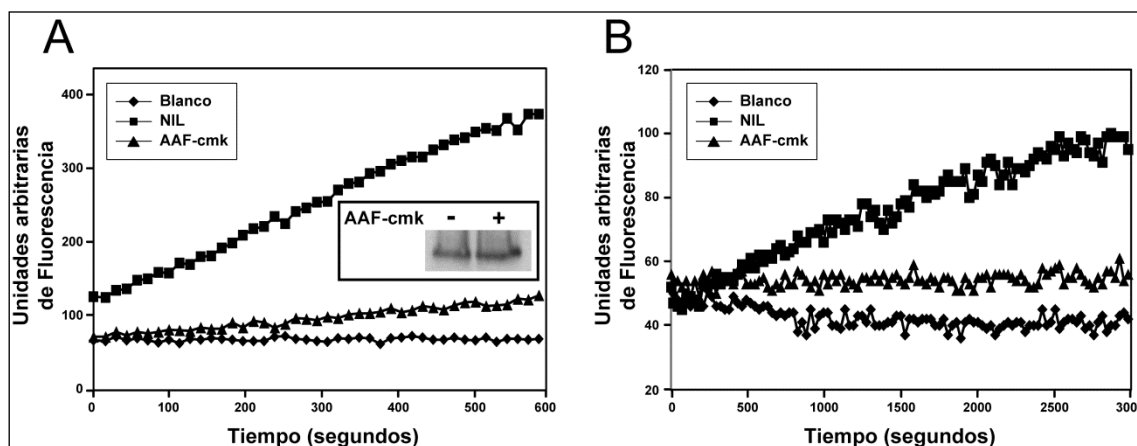
**Figura 8.** Efecto de la inhibición de USP7 y USP14 sobre los resultados obtenidos en la Figura 7A. Las células se trataron con 100  $\mu$ M AAF-cmk durante 2 horas y los lisados celulares se incubaron en presencia de la sonda HA-Ub-VS durante una hora más. Las muestras se analizaron por WB anti-USP7 o anti-USP14 y anti-HA utilizando anticuerpos secundarios con distintos fluorocromos (700 nm anti-DUB y 800 nm anti-HA). El análisis de las intensidades de cada banda se realizó con el programa ImageJ.

### 3. Caracterización de la inhibición de USP7

Con el objetivo de confirmar de forma independiente la inhibición de USP7, se realizó un ensayo de actividad enzimática utilizando el sustrato fluorogénico Ub-amc. Para ello, se inmunoprecipitó la proteína de células tratadas en presencia o ausencia de AAF-cmk (150  $\mu$ M) durante dos horas y se analizó la hidrólisis del sustrato monitorizando la fluorescencia cada 15 segundos. Como se puede ver en la Figura 9A, el tratamiento con AAF-cmk resulta en una inhibición de la actividad de USP7 superior al 80%. Para confirmar que en ambas muestras teníamos la misma cantidad de proteína, y



por tanto la reducción en la actividad enzimática se debía al tratamiento con AAF-cmk, se analizó por WB anti-USP7 una fracción equivalente del inmunoprecipitado de cada muestra. Como se ve en el interior de la figura, las cantidades de la proteína eran similares en los dos casos.



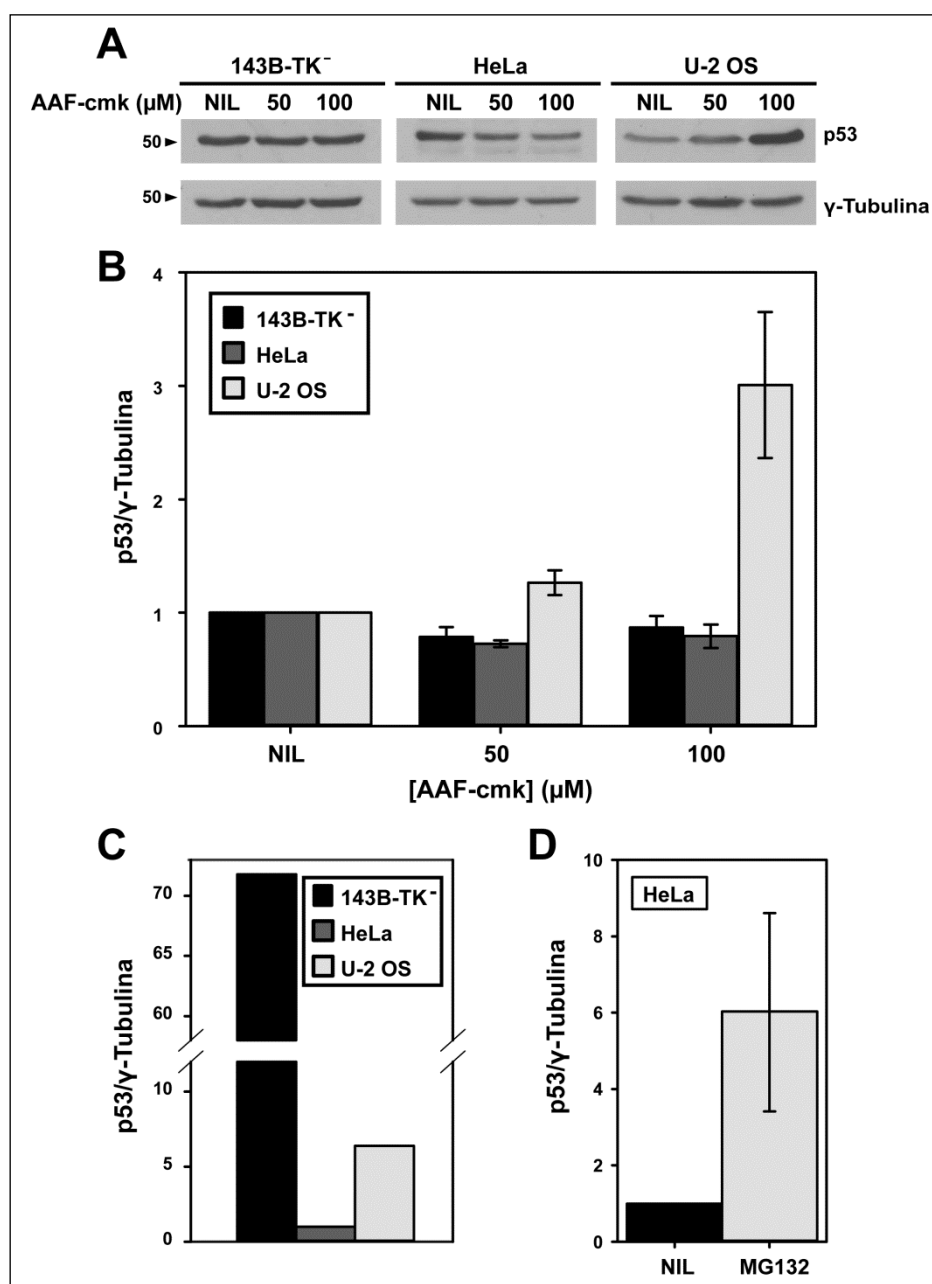
**Figura 9.** Efecto de la inhibición de USP7 sobre la hidrólisis de Ub-amc. (A) USP7 se inmunoprecipitó de células tratadas en presencia o ausencia de 150  $\mu$ M AAF-cmk durante 2 horas y a continuación se analizó la actividad enzimática de la proteína mediante la hidrólisis del sustrato Ub-amc. En el interior de la figura se muestra un WB con las cantidades de proteína de cada muestra; (B) Hidrólisis del sustrato Ub-amc por USP7 inmunoprecipitado de células sin tratar y posteriormente incubado con 150  $\mu$ M AAF-cmk durante 1 hora.

Teniendo en cuenta que el inhibidor, al ser un tripéptido con el extremo N-terminal libre, podría estar siendo recortado por alguna aminopeptidasa celular, y por tanto, ser una variante del mismo (AAF-cmk, AF-cmk o F-cmk) la responsable de la inhibición de USP7, analizamos el efecto de AAF-cmk sobre USP7 previamente inmunoprecipitado a partir de células no tratadas. Tras la inmunoprecipitación, USP7 se incubó con o sin 150  $\mu$ M AAF-cmk durante una hora a 37 °C y, a continuación, se analizó la actividad enzimática del mismo modo que en el caso anterior. Los resultados obtenidos muestran que la forma completa del inhibidor (AAF-cmk) es capaz de bloquear la actividad enzimática de USP7 de una forma similar a como lo hace sobre células vivas (Figura 9B).

### 3.1. AAF-cmk induce la acumulación de p53

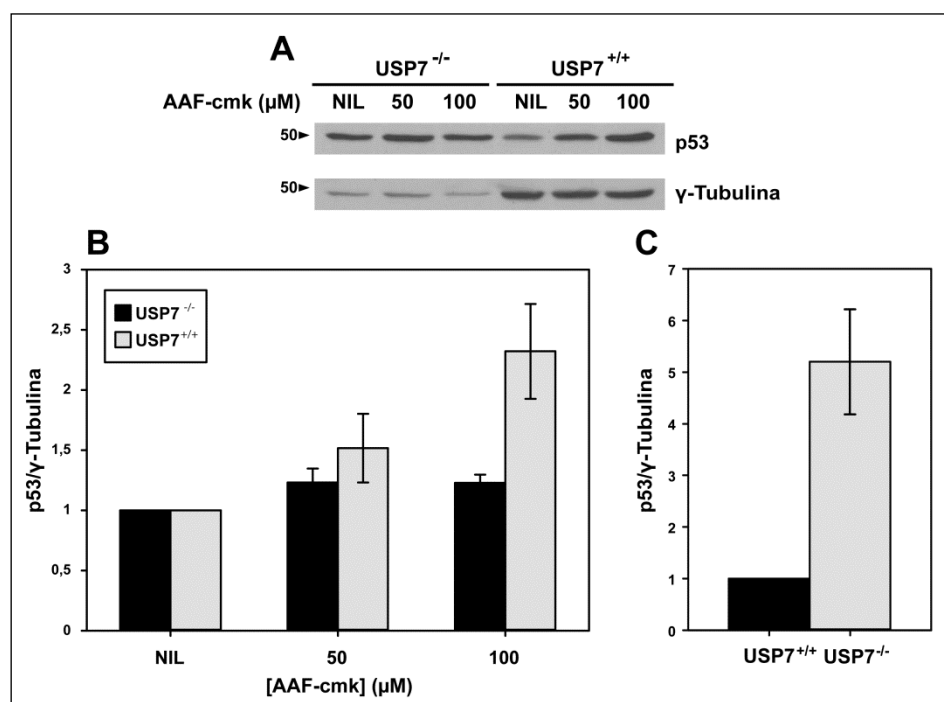
Una vez confirmada la inhibición de USP7 por AAF-cmk decidimos evaluar el efecto de dicha inhibición en células vivas. Para ello, se analizó el efecto de AAF-cmk sobre los niveles de p53 en distintas líneas celulares que se eligieron según las características de dicha proteína: 1) 143B-TK<sup>-</sup> cuyo p53 es mutante y estable (Romano et al., 1989), 2) HeLa que tiene un p53 silvestre

pero controlado por la proteína E6 del virus del papiloma humano y por ello independiente de Mdm2/USP7 (Hengstermann et al., 2001) y, 3) U-2 OS con un p53 silvestre dependiente de USP7 (Ottaviano et al., 2010).



**Figura 10.** Efecto de AAF-cmk sobre p53 en distintas líneas celulares. (A) WB de un experimento representativo. Las células se trataron en ausencia o presencia de 50 μM o 100 μM AAF-cmk durante 6 horas. La γ-Tubulina se muestra como control de carga; (B) Cuantificación de 3 experimentos diferentes, normalizada a los niveles basales de p53 para cada línea celular. Las barras de error muestra desviación estándar; (C) Cuantificación de los niveles relativos basales de p53 en cada una de las líneas celulares estudiadas; (D) Cuantificación de la acumulación de p53 en la línea celular HeLa en respuesta al inhibidor de proteasoma MG132. Se muestra la media de 3 experimentos con su desviación estándar. Las células se trataron en presencia o ausencia de 20 μM MG132 durante 2 horas y los lisados celulares se analizaron por WB.

Las células se trataron con dos concentraciones diferentes del inhibidor (50  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$ ) durante 6 horas y las muestras se analizaron por WB. Como se observa en la Figura 10C, las tres líneas celulares tienen niveles de p53 muy distintos y como sería de esperar en el caso de una inhibición significativa de USP7 por AAF-cmk, sólo se produjo una acumulación de p53 en U-2 OS, siendo más evidente a 100  $\mu\text{M}$ . En el caso de 143B-TK<sup>-</sup> o HeLa no se observó ningún cambio significativo (Figuras 10A y 10B), si acaso observamos una pequeña disminución en HeLa, algo similar a lo que se ve en la Figura 4C en Li et al., 2004. Este dato es particularmente relevante pues en estas células la degradación de p53 por el proteasoma es muy rápida, como corrobora su acumulación después del tratamiento, durante dos horas, con el inhibidor del proteasoma MG132 (Figura 10D).



**Figura 11.** La acumulación de p53 por AAF-cmk se debe a la inhibición de USP7. (A) WB representativo de un experimento. Las distintas variantes de la línea celular HCT116 (USP7<sup>+/+</sup> y USP7<sup>-/-</sup>) se trataron en ausencia o presencia de 50  $\mu\text{M}$  o 100  $\mu\text{M}$  AAF-cmk durante 24 horas. Como control de carga se muestra la  $\gamma$ -Tubulina; (B) Cuantificación de los niveles de p53 de 3 experimentos diferentes normalizada al tratamiento control. Las barras de error muestran la desviación estándar; (C) Cuantificación de los niveles relativos basales de p53 en las dos variantes de la línea celular normalizados a las células USP7<sup>+/+</sup>. La figura muestra la media de 3 experimentos con su desviación estándar.

A continuación confirmamos que la acumulación de p53 es dependiente de la inhibición de USP7 por AAF-cmk. Para ello, utilizamos la línea celular

---

HCT116, con un p53 salvaje, y su *Knock out* para USP7 (USP7<sup>-/-</sup>). Como era de esperar, se detectaron unos niveles más altos de p53 en la línea sin USP7 (Figura 11C). En consonancia con nuestros resultados anteriores, sólo la línea parental mostró una acumulación de p53 en respuesta al tratamiento de las células con el inhibidor durante 24h (Figuras 11A y 11B).

### **3.2. AAF-cmk promueve la inestabilidad de Mdm2**

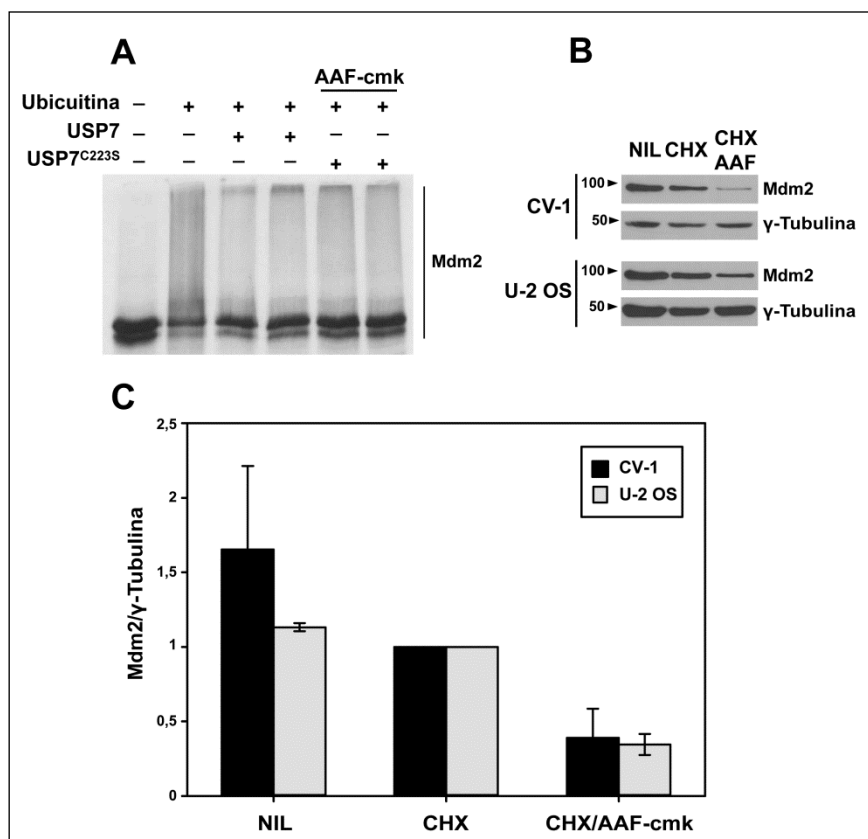
Los resultados obtenidos hasta ahora implicarían una estabilización de p53 por AAF-cmk como resultado de una reducción en la actividad de Mdm2, muy probablemente debida a una mayor autoubicuitilación y degradación cuando la actividad de USP7 se ve disminuida.

Con el objetivo de abordar esta cuestión decidimos analizar el efecto de AAF-cmk sobre la desubicuitilación de Mdm2 *in vitro*. Para ello se procedió a la traducción de Mdm2 en presencia de metionina marcada con radioactividad <sup>35</sup>S y su posterior ubicuitilación. Los ensayos de desubicuitilación se realizaron incubando la ligasa ubicuitilada en presencia de USP7 catalíticamente activo o inactivo (traducidos también *in vitro* pero en ausencia de radioactividad) tratados previamente con o sin 150 µM AAF-cmk. Para estos experimentos se utilizaron los plásmidos pCI-Myc-His USP7 y pCI-Myc-His USP7<sup>C223S</sup> ya que no se consiguió traducir la proteína catalíticamente inactiva en el vector pCI.

Como se muestra en la Figura 12A, los resultados no fueron concluyentes; aunque parece que haya una ligera reducción de la ubicuitilación de Mdm2 en el carril correspondiente a la muestra incubada con USP7 activo, la diferencia con los carriles en los que en principio no debería de haber desubicuitilación no es significativa, por lo que por los resultados de este experimento no pudimos afirmar que AAF-cmk esté bloqueando la desubicuitilación de Mdm2.

Dado que estos experimentos fueron inconcluyentes, decidimos probar nuestra hipótesis en células vivas. Dado que Mdm2 es un sustrato transcripcional de p53, para poder observar cambios en su estabilidad fue necesaria la inhibición de la síntesis de proteínas con CHX en estos experimentos. Dos líneas celulares (U-2 OS y CV1) se trataron con 100 µM AAF-cmk en presencia de CHX durante 18 horas y los niveles de Mdm2 se analizaron por WB. Los resultados mostraron una disminución en los niveles de

Mdm2 en presencia de AAF-cmk en comparación con las muestras no tratadas (Figuras 12B y 12C). Esta reducción de la estabilidad de Mdm2 en presencia de AAF-cmk podría explicar, al menos en parte, la acumulación de p53 inducida por el inhibidor.

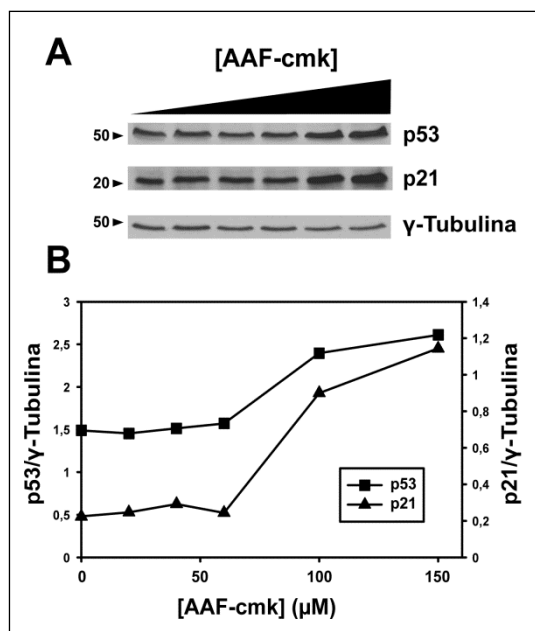


**Figura 12.** AAF-cmk promueve la desestabilización de Mdm2. (A) Desubiquitilación *in vitro* de Mdm2 por USP7 en ausencia o presencia de AAF-cmk. Mdm2 ubiquitilado (traducido en presencia de metionina <sup>35</sup>S y ubiquitilado *in vitro*), se incubó con USP7 catalíticamente activo o inactivo (traducido también *in vitro*) previamente tratado en presencia o ausencia de 150  $\mu$ M AAF-cmk. Las muestras se procesaron por SDS-PAGE y los geles secos se visualizaron en autorradiografías; (B) Las líneas celulares U-2 OS y CV1 se trataron con 100  $\mu$ M AAF-cmk en presencia o ausencia de CHX durante 18 horas y los niveles de Mdm2 se analizaron por WB. Como control de carga se muestra la  $\gamma$ -Tubulina; (C) Cuantificación de 3 experimentos diferentes en los que se muestra la media de los niveles relativos de Mdm2 normalizadas al tratamiento con CHX. Las barras de error muestran desviación estándar.

### 3.3. La proteína p53 que se acumula por AAF-cmk es transcripcionalmente activa

Con el fin de analizar las posibles consecuencias funcionales de la inhibición de USP7 por AAF-cmk evaluamos si el p53 que se acumula en respuesta al inhibidor era transcripcionalmente activo. Para ello se estimaron los niveles de p21 (uno de los sustratos transcripcionales de p53) en respuesta

a concentraciones crecientes de AAF-cmk en las células CV-1 tras un tratamiento de 24 horas. Como se muestra en la Figura 13, AAF-cmk indujo una acumulación de p21 dependiente de concentración paralela a la acumulación de p53.



**Figura 13.** AAF-cmk induce la acumulación de p53 transcripcionalmente activo. (A) La línea celular CV1 se trató con concentraciones crecientes de AAF-cmk durante 24 horas y los lisados celulares se analizaron por WB con anti-p53 y anti-p21. La  $\gamma$ -Tubulina se muestra como control de carga; (B) Cuantificación del experimento anterior.

En resumen, nuestros datos muestran que AAF-cmk bloquea la actividad de USP7 dando como resultado una estabilización de p53 transcripcionalmente activo.

### 3.4. USP7 y la formación de agrosomas

Por último, decidimos analizar si la inhibición de USP7 era responsable de la acumulación de proteínas poliubicitiladas en respuesta a AAF-cmk. Para ello, se intentó generar, a partir de la línea celular 143B-TK<sup>-</sup>, variantes con diferentes niveles de expresión para la proteína.

En primer lugar, se transfectó la línea parental con los plásmidos pcDNA3.1-Myc-His USP7 y pcDNA3.1-Myc-His USP7<sup>C223S</sup>, si bien no obtuvimos evidencias claras de obtener transfectantes positivos.

Con el objetivo de generar una variante con baja expresión de USP7, se transdujeron las células con un vector lentiviral con un RNA de interferencia para la enzima. Estas células se caracterizaron por dividirse muy lentamente y tener una vida media muy corta por lo que nos fue imposible hacer ningún tipo de experimento interpretable con ellas.

Por lo tanto, no hemos podido determinar si la inhibición de USP7 es responsable o no de la formación de agresomas inducida por AAF-cmk.

#### **4. USP14 afecta a la formación de agresomas**

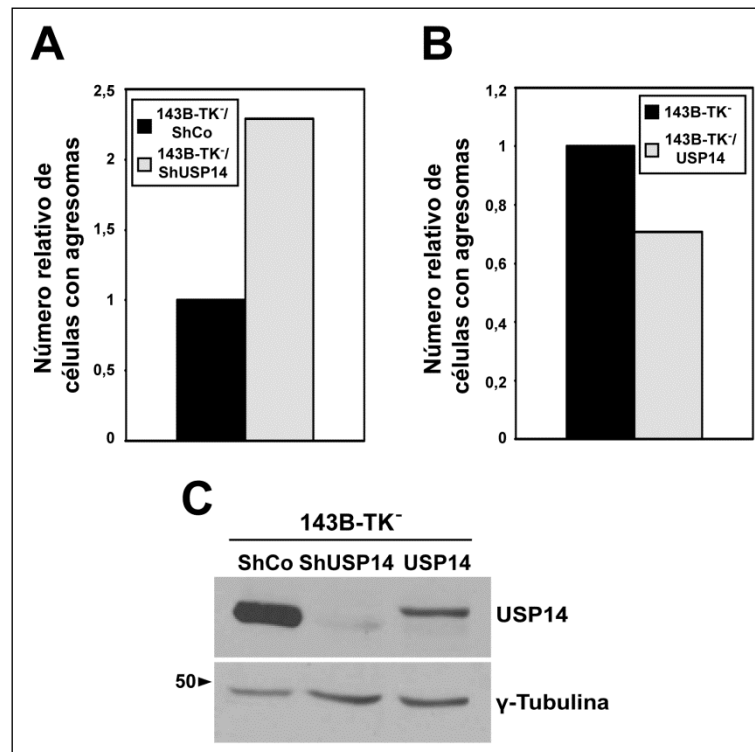
Otra de las DUBs que identificamos como diana de AAF-cmk es USP14. Esta hidrolasa resulta potencialmente interesante puesto que, como se mencionó en la Introducción, se ha visto su papel regulador de la proteólisis por el proteasoma; además se ha comprobado también que mutantes de Ubp6, el ortólogo de USP14 en levaduras, son esenciales para mantener la viabilidad de cepas aneuploides; ello se debe a un ajuste por proteólisis de la descompensación de proteínas producida por las alteraciones de la dosis génica (Torres et al., 2010).

Para determinar qué papel juega USP14 en la formación de agresomas se comparó la respuesta al tratamiento con AAF-cmk en distintas variantes de la línea 143B-TK<sup>-</sup> con diferentes niveles de expresión de la enzima.

Por un lado, se generó un transfectante de sobreexpresión de la enzima (143B-TK<sup>-</sup>/USP14) utilizando el plásmido pcDNA 3.1-Myc-His USP14. Por otra parte, generamos una línea de baja expresión (143B-TK<sup>-</sup>/ShUSP14), transduciendo las células con un vector lentiviral que contiene un RNA de interferencia específico para USP14. Como control de transducción, se utilizó un vector lentiviral con un RNA de interferencia inespecífico que no presenta ninguna diana en células humanas (143B-TK<sup>-</sup>/ShCo).

La formación de agresomas se analizó por inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo FK2, comparando la respuesta a AAF-cmk a la concentración a la que el 40-60% de las células control presentaban agresomas tras un tratamiento de cuatro horas.

Como se puede observar en la Figura 14, los niveles de USP14 presentes en las células son un factor importante en la formación de agresomas en respuesta al tratamiento con AAF-cmk. Una sobreexpresión de la proteína resultó en un menor número de células con agresomas en comparación con las células control mientras que un silenciamiento de la proteína tuvo el efecto contrario, aumentando en más de dos veces las células que presentaban agresomas.



**Figura 14.** Efecto de USP14 en la formación de agregomas. (A) Comparación del número relativo de células con agregomas entre células 143B-TK-/ShCo y 143B-TK-/ShUSP14. Las células se trataron con distintas concentraciones de AAF-cmk durante 4 horas. A continuación se fijaron, permeabilizaron y se tiñeron con el anticuerpo FK2; (B) Las células 143B-TK- y su variantes de sobreexpresión 143B-TK-/USP14 se trataron y procesaron igual que en (A). En ambos casos, el análisis se realizó a la concentración de AAF-cmk a la cual entorno al 50% de las células control presentaban agregomas. Los datos se han normalizado a las células control; (C) WB en el que se representan los niveles de USP14 de las distintas variantes de 143B-TK- utilizadas. Como control de carga se muestran los niveles de  $\gamma$ -Tubulina.

De esta forma, la inhibición de USP14 por AAF-cmk podría ser, al menos en parte, la responsable de la acumulación de proteínas poliubicitiladas que observamos al tratar estas células con el inhibidor.

## 5. AAF-cmk induce una respuesta de estrés

AAF-cmk tiene una toxicidad selectiva sobre algunas líneas celulares tumorales induciendo una acumulación de proteínas poliubicitiladas. Si comparamos la respuesta a AAF-cmk de dos líneas de osteosarcoma, 143B-TK- y U-2 OS, podemos observar que la formación de agregomas a tiempos cortos sólo se produce en las células 143B-TK- independientemente de la concentración del inhibidor utilizada. Además, estas células presentan una resistencia a AAF-cmk mucho menor que las U-2 OS, las células 143B-TK- comienzan a morir a las dos horas de tratamiento con 150  $\mu$ M del inhibidor,

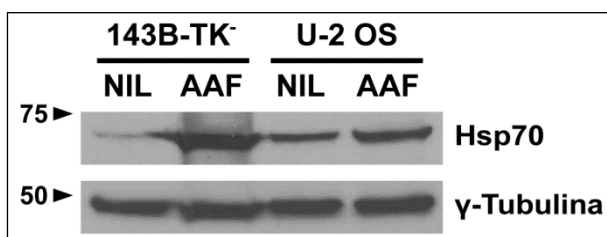


mientras que las U-2 OS pueden soportar hasta 24 horas. Estas diferencias nos llevaron a evaluar el efecto del inhibidor sobre el estrés proteotóxico, uno de los objetivos terapéuticos de interés reciente.

### 5.1. Efecto de AAF-cmk sobre el estrés citosólico

Las chaperonas citosólicas son esenciales para el correcto plegamiento de las proteínas en el citosol. En condiciones de estrés los niveles de estas chaperonas se “disparan” con el objetivo de mantener la proteostasis celular. Una de estas chaperonas es la proteína Hsp70, el ejemplo paradigmático de chaperonas inducibles por estrés en citosol, como es el caso del choque térmico, y controlada por el factor de transcripción maestro de esta respuesta, HSF1 (Heat Shock Factor 1) (Ankar and Sistonen, 2011). Hsp70 está involucrada en numerosas funciones que van desde el correcto plegamiento y estabilización de las proteínas hasta funciones de control de calidad jugando un papel central en la toma de decisiones respecto a la degradación o rescate de proteínas mal plegadas o agregadas (Bukau et al., 2006).

Con el objetivo de analizar el posible efecto de AAF-cmk sobre el estrés en el citosol, se trataron las líneas celulares 143B-TK<sup>-</sup> y U-2 OS con el inhibidor (100  $\mu$ M) durante 6 horas y se analizaron los niveles de Hsp70 por WB.



**Figura 15.** Efecto de AAF-cmk sobre Hsp70. Los lisados celulares de células 143B-TK<sup>-</sup> y U-2 OS tratadas con 100  $\mu$ M AAF-cmk durante 6 horas se procesaron por WB con anti-Hsp70. Como control de carga se muestra la  $\gamma$ -Tubulina.

Como se puede ver en la Figura 15, AAF-cmk induce un fuerte aumento en los niveles de Hsp70 en las células 143B-TK<sup>-</sup> mientras que el efecto en las U-2 OS es de menos envergadura.

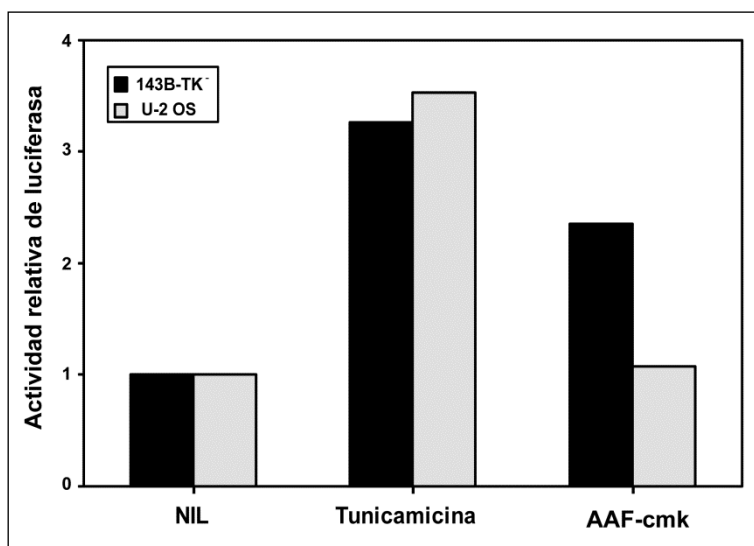
### 5.2. Efecto de AAF-cmk sobre el estrés de retículo

La inducción de Hsp70 muestra la existencia de una respuesta de estrés en el citosol, y nos planteamos estudiar si de igual forma AAF-cmk estaba induciendo un estrés en otros compartimentos celulares. En particular procedimos a analizar si se producía una respuesta de estrés de retículo endoplasmático, cuya activación por diferentes vías determina el futuro de la

célula, desde la recuperación de la proteostasis hasta el arresto de ciclo celular o muerte.

La primera aproximación que se llevó a cabo para evaluar si AAF-cmk induce estrés de retículo fue analizar los niveles de CHOP. CHOP es un factor de transcripción que juega un papel esencial en la respuesta a estrés. Los niveles basales de esta proteína son prácticamente indetectables si bien su expresión se induce de una forma considerable bajo una situación de estrés de retículo, lo que resulta en un arresto del ciclo celular y finalmente apoptosis (Zinszner et al., 1998).

Se transfectaron, de forma transitoria, las líneas celulares 143B-TK<sup>-</sup> y U-2 OS con la construcción pXP2-CHOP, que expresa luciferasa bajo el control del promotor de CHOP. Tras el tratamiento en presencia o ausencia de 50  $\mu$ M AAF-cmk durante 18 horas, se analizó la expresión de luciferasa. Como control de inducción de estrés de retículo se trataron las células con 2,5  $\mu$ g/ml tunicamicina, un antibiótico que inhibe la N-glicosilación de proteínas translocadas al retículo endoplasmático induciendo estrés en este compartimento.



**Figura 16.** AAF-cmk induce la expresión de CHOP en las células 143B-TK<sup>-</sup>. Las líneas celulares 143B-TK<sup>-</sup> y U-2 OS se transfectaron con el plásmido pXP2-CHOP. 48 horas tras la transfección, las células se trataron con 50  $\mu$ M AAF-cmk o 2,5  $\mu$ g/ml tunicamicina durante 18 horas. La inducción de CHOP se analizó midiendo la actividad luciferasa de cada muestra. En la figura los datos están normalizados a las muestras control.

En la Figura 16 se muestra como la tunicamicina induce la expresión de luciferasa en estos transfectantes, reflejando una inducción de CHOP de hasta

tres veces en comparación con los niveles basales en ambas líneas celulares, mientras que el tratamiento con AAF-cmk sólo es capaz de generar un efecto en las células 143B-TK<sup>-</sup>. En estas células la actividad relativa de la luciferasa aumenta dos veces respecto a los niveles basales mientras que en las U-2 OS el aumento que se observa es marginal.

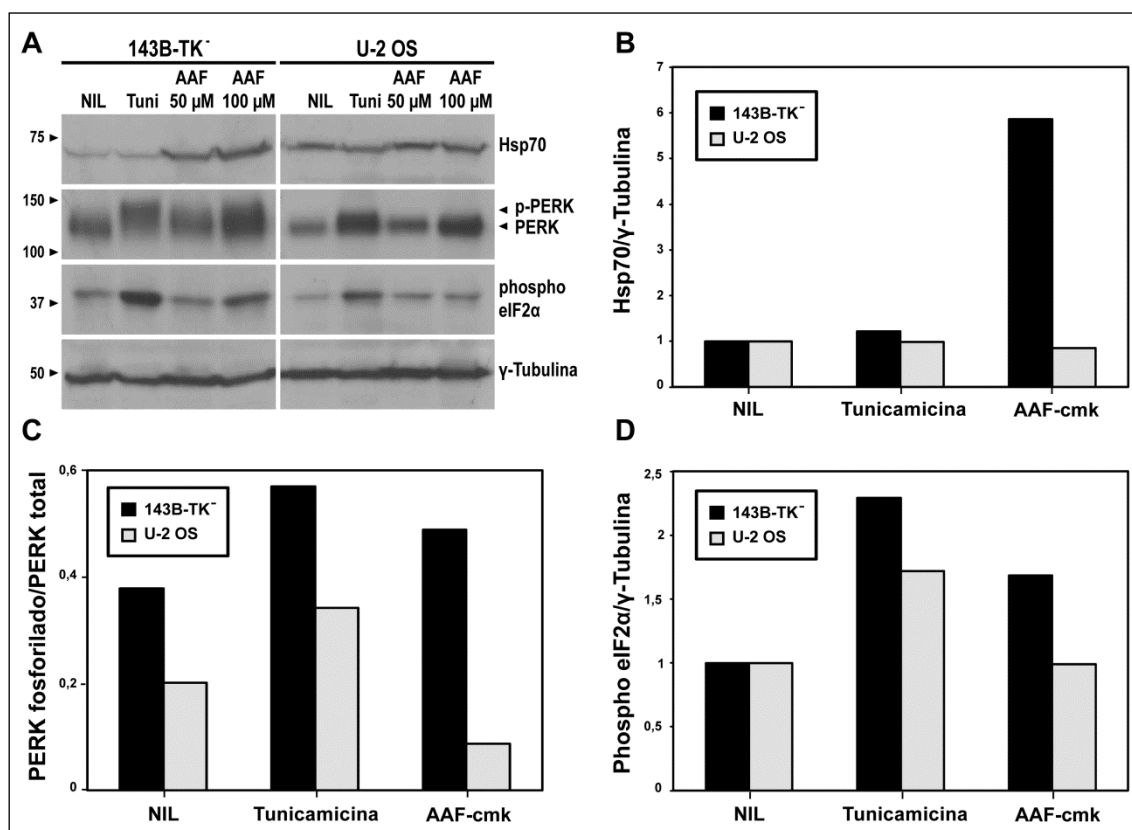
A continuación, procedimos a analizar más en detalle por qué ruta se induce la expresión de CHOP. La respuesta al estrés de retículo se puede llevar a cabo por tres vías canónicas a través de tres proteínas asociadas a la membrana del retículo endoplasmático, PERK, ATF6 e IRE1. Su mecanismo de acción se debe, al menos parcialmente, a que se unen a la chaperona BIP que las mantiene inactivas. En condiciones de estrés de retículo, BIP se une a las proteínas mal plegadas, liberando y activando a PERK, ATF6 e IRE1 lo que va a resultar en la transcripción de genes relacionados con la respuesta a estrés entre los que se encuentra CHOP.

Para evaluar el efecto de AAF-cmk sobre la vía de PERK, se trataron las células con el inhibidor (100  $\mu$ M) o tunicamicina (4  $\mu$ g/ml) durante 6 horas y las muestras se procesaron por WB (Figura 17). En respuesta al estrés de retículo, PERK se activa fosforilándose, dando lugar a un cambio en el patrón de movilidad electroforética de la proteína. Los resultados obtenidos muestran un cambio significativo en el patrón de bandas de PERK en las células 143B-TK<sup>-</sup> tratadas con tunicamicina, confirmando la inducción de estrés de retículo inducido por el antibiótico. En el caso de las U-2 OS la activación de PERK no es tan evidente, pudiéndose observar las dos formas de la proteína. Las diferencias observadas en respuesta a la tunicamicina podrían explicarse, al menos en parte, por la presencia en condiciones basales de PERK fosforilado en las 143B-TK<sup>-</sup> pero no en las U-2 OS como se ve en las Figuras 17A y 17C, lo que sugiere que las dos líneas tienen niveles de estrés constitutivo muy diferentes. La línea 143B-TK<sup>-</sup> está sometida a un estrés de retículo, en condiciones basales, superior a las U-2 OS.

En cuanto al tratamiento con AAF-cmk, a 100  $\mu$ M el inhibidor indujo una respuesta de estrés en la línea 143B-TK<sup>-</sup>, si bien menor al inducido por la tunicamicina. Por el contrario, no se observó ningún efecto del inhibidor en las

células U-2 OS. Estos datos concuerdan con los de inducción del promotor de CHOP de la Figura 16.

La activación de PERK conlleva la fosforilación de eIF2 $\alpha$ , que va a ser el responsable de la inducción selectiva de algunos genes implicados en la respuesta a estrés de retículo como son ATF4 o CHOP (Harding et al., 2000). En consonancia con los resultados obtenidos con PERK, el tratamiento con tunicamicina en las células 143B-TK<sup>-</sup> indujo un aumento en los niveles de la proteína fosforilada en comparación con el control. En el caso de las U-2 OS la inducción fue menor, como sería de esperar por la activación de PERK. El tratamiento con AAF-cmk a 100  $\mu$ M causa una fosforilación significativa de eIF2 $\alpha$  en las células 143B-TK<sup>-</sup>. Como en el caso anterior, AAF-cmk no tuvo ningún efecto sobre la fosforilación de eIF2 $\alpha$  en las U-2 OS.



**Figura 17.** Efecto de AAF-cmk sobre el estrés proteotóxico. (A) Las células se trataron con AAF-cmk (50  $\mu$ M o 100  $\mu$ M) o 4  $\mu$ g/ml tunicamicina durante 6 horas. Los lisados celulares se procesaron por WB con anti-Hsp70, anti-PERK y anti-phospho-eIF2 $\alpha$ . Como control de carga se muestra la  $\gamma$ -Tubulina; (B) Cuantificación de los niveles de Hsp70 normalizados a las muestras sin tratar; (C) Cuantificación de los niveles de PERK fosforilado en relación a los niveles totales de la proteína; (D) Cuantificación de los niveles de eIF2 $\alpha$  fosforilado normalizado a las células sin tratar. En (B), (C) y (D) sólo se muestra la cuantificación para la mayor concentración de AAF-cmk (100  $\mu$ M).

Como control de compartimentalización de estrés citosólico y de retículo, la tunicamicina no indujo la expresión de Hsp70 en ninguna de las líneas celulares.

En resumen, los datos sugieren que AAF-cmk induce una respuesta de estrés de retículo, a través de la vía de PERK, en las células 143B-TK<sup>-</sup>, pero no en las U-2 OS. Este dato concuerda con la observación de que las dos líneas celulares presentan un estrés basal diferente, lo que podría llevar a una diferencia importante respecto al umbral de estrés que pueden soportar, tanto en el caso de tunicamicina como de AAF-cmk.

## **6. Análisis del efecto de AAF-cmk sobre autofagia**

La vía de autofagia constituye la segunda vía de degradación de sustratos citosólicos. Un defecto en la autofagia puede resultar en la acumulación de proteínas poliubiquitiladas en el citoplasma (Komatsu et al., 2006; Hara et al., 2006).

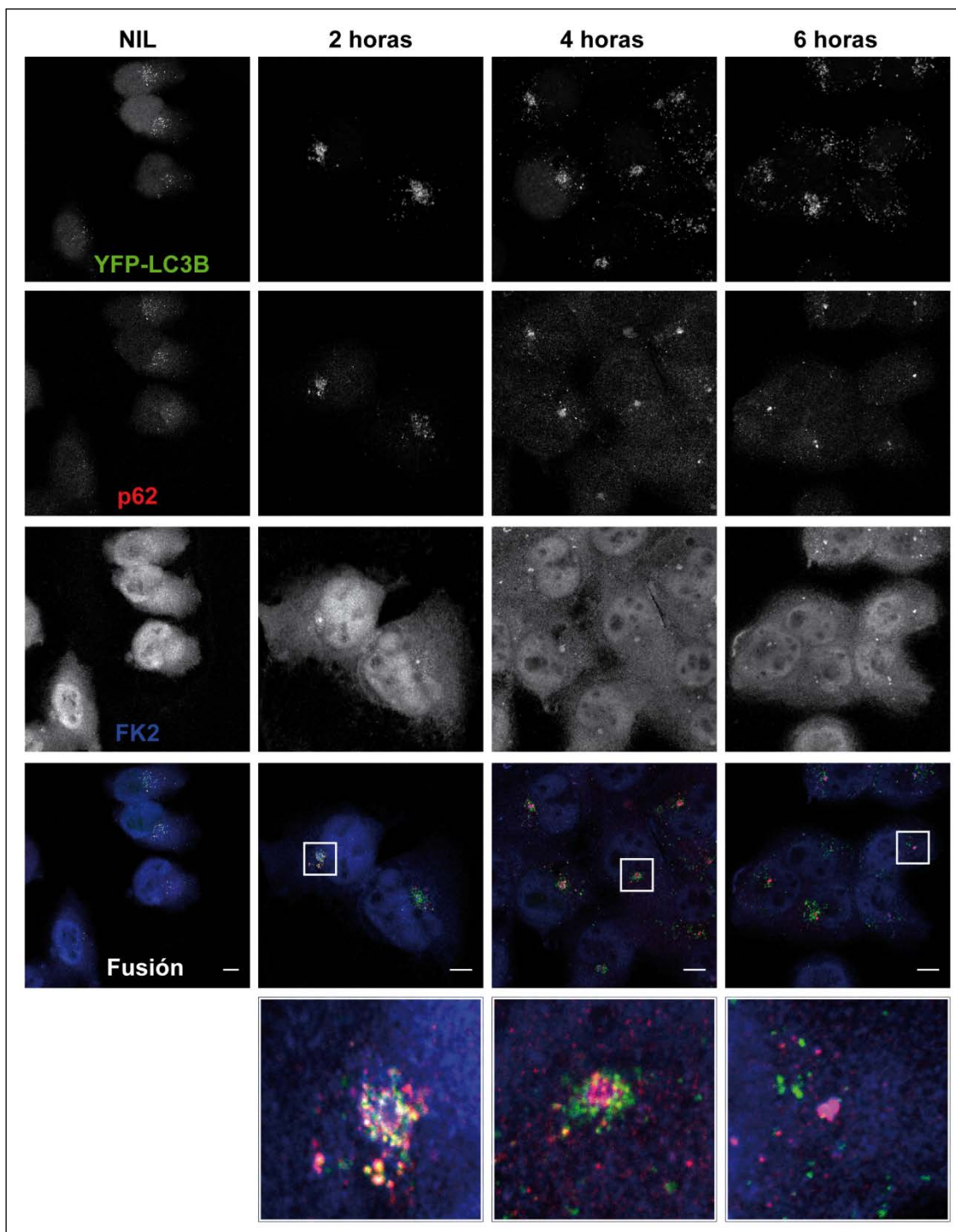
### **6.1. AAF-cmk induce un cambio en la distribución de YFP-LC3B, p62 y NBR1**

Con el objetivo de ver cómo afecta AAF-cmk al proceso de autofagia, analizamos la distribución de algunos de sus marcadores en las células como son LC3B y los adaptadores p62 y NBR1. Para ello se llevaron a cabo experimentos de inmunofluorescencia con los anticuerpos anti-p62 y FK2 o anti-NBR1 a distintos tiempos (2, 4 y 6 horas) y a 50  $\mu$ M de AAF-cmk, en células 143B-TK<sup>-</sup> transfectadas de forma estable con EYFP-LC3B.

Los resultados obtenidos mostraron un cambio de distribución de YFP-LC3B a lo largo del tiempo. A dos horas, la mayor parte de la proteína se encuentra concentrada rodeando al agresoma, mientras que a lo largo del tiempo se va dispersando por el citoplasma, lo que resulta más ostensible a 6 horas.

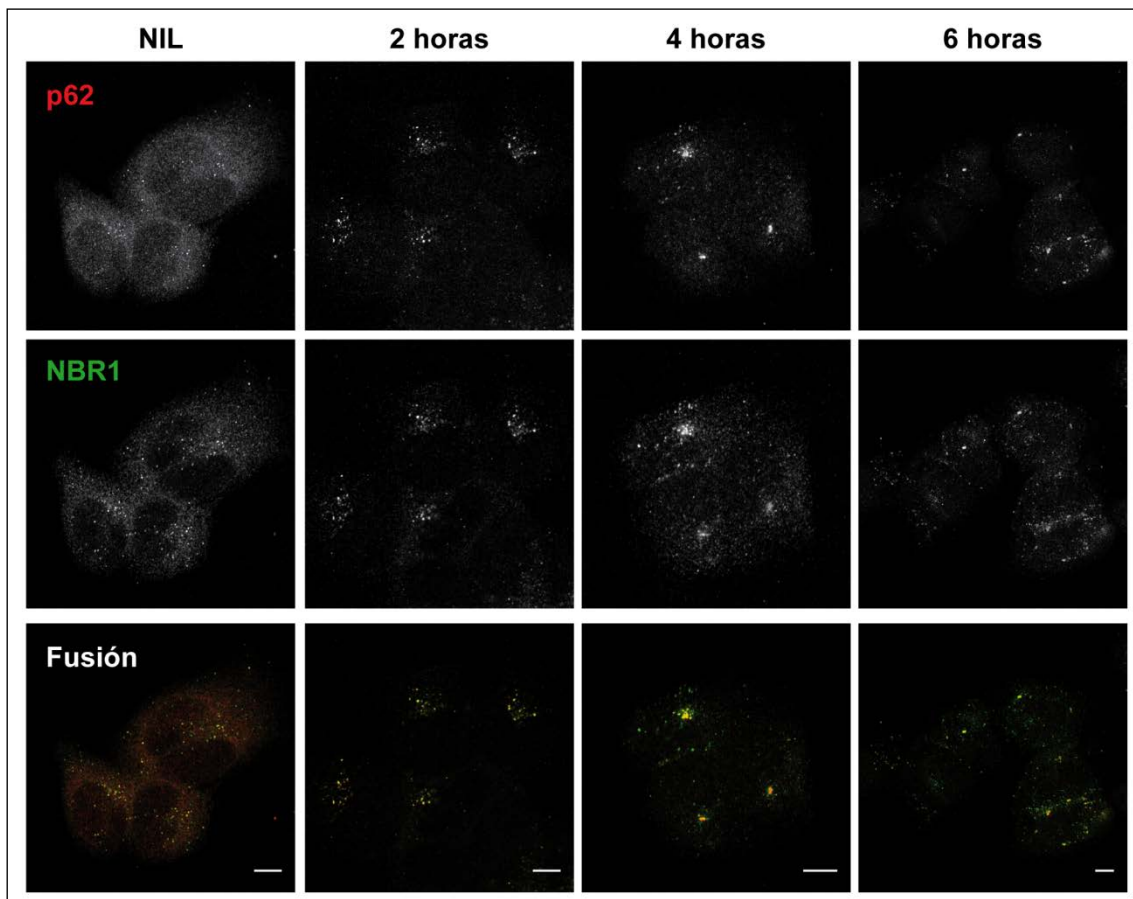
En cuanto a p62, a tiempos cortos colocaliza con LC3B alrededor del agresoma ya preexistente. Sin embargo, a tiempos más largos p62 se encuentra en los agresomas, colocalizando con las proteínas poliubiquitiladas y con escasa colocalización con LC3B (Figura 18). NBR1 colocalizó en todo

momento con p62 (Figura 19), de acuerdo con los resultados publicados (Kirkin et al., 2009a).

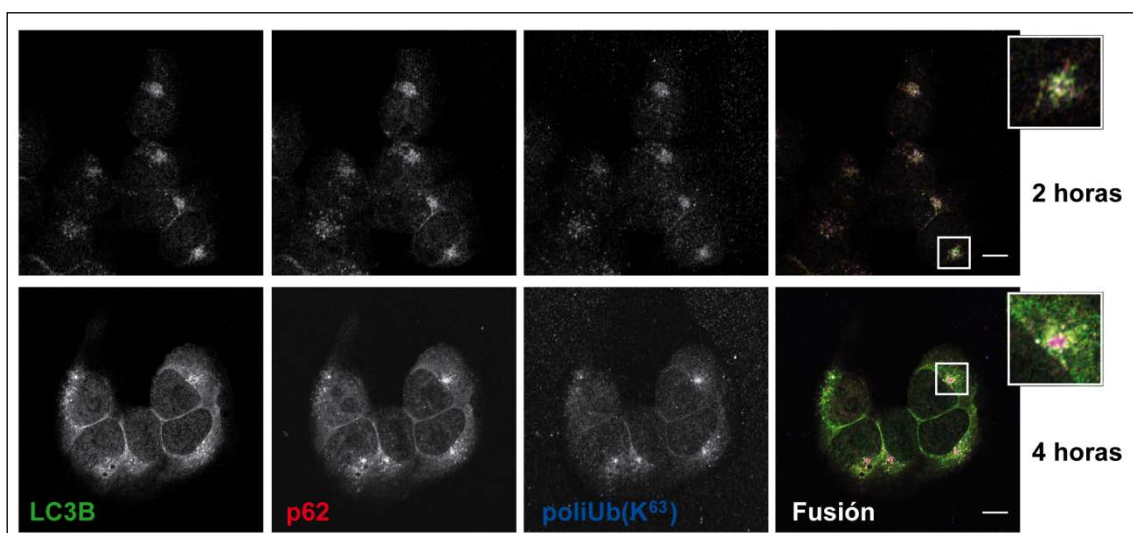


**Figura 18.** AAF-cmk induce un cambio en la distribución de YFP-LC3B y p62. La línea celular 143B-TK- transfectada de forma estable con EYFP-LC3B se trató con 50  $\mu$ M AAF-cmk a distintos tiempos (2, 4 y 6 horas). Las células se procesaron para microscopía confocal utilizando los anticuerpos anti-p62 y FK2. Las imágenes inferiores son una ampliación de la zona señalada con un cuadrado blanco. Las barras corresponden a 10  $\mu$ m.



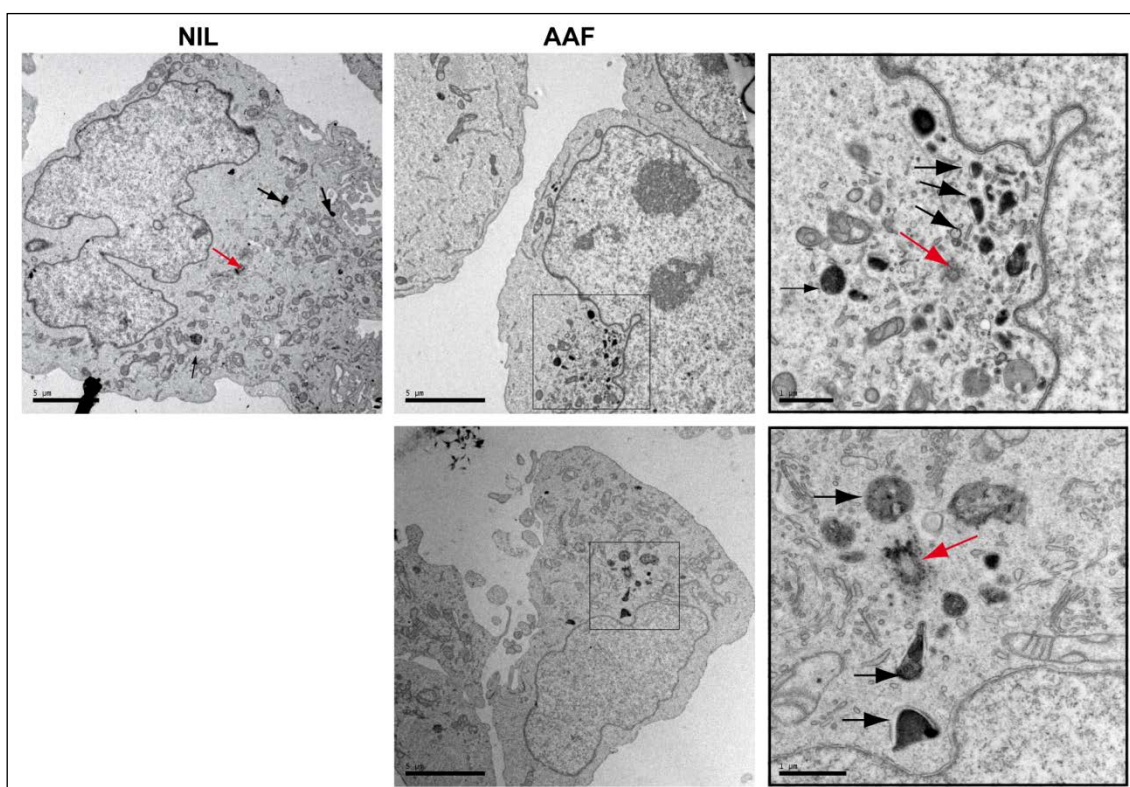


**Figura 19.** p62 y NBR1 colocalizan en todo momento. La localización de p62 y NBR1 se analizó en células 143B-TK/EYFP-LC3B tratadas con 50  $\mu$ M AAF-cmk a lo largo del tiempo (2, 4 y 6 horas). Las muestras se procesaron por microscopía celular utilizando los anticuerpos anti-p62 y anti-poliUb(K<sup>63</sup>). Las barras corresponden a 10  $\mu$ m.



**Figura 20.** Las proteínas poliubiquitiladas que se acumulan en los agregomas presentan enlaces K63. Las células 143B-TK- se trataron con 50  $\mu$ M AAF-cmk durante 2 ó 4 horas. Las muestras se procesaron para microscopía confocal utilizando los anticuerpos anti-LC3B, anti-p62 y anti-poliUb(K<sup>63</sup>). Las barras corresponden a 10  $\mu$ m. La imagen correspondiente a 2 horas de tratamiento es una combinación de tres planos en el eje Z.

p62 se une sobre todo a proteínas poliubiquitiladas a través de enlaces K63 (Tan et al., 2008), por lo que decidimos analizar si en los agresomas, en los que se acumula p62, se encontraban proteínas poliubiquitiladas de este tipo. Se realizaron experimentos similares a los descritos arriba, pero utilizando células no transfectadas y tiñendo con los anticuerpos anti-LC3B, anti-p62 y anti-poliUb(K<sup>63</sup>). Los resultados obtenidos mostraron que p62 y las proteínas modificadas con poliubiquitina-K63 colocalizan en todo momento, separándose de LC3B endógeno a partir de las 4 horas de tratamiento (Figura 20). Por tanto, los agresomas existentes a 2 horas contendrían probablemente proteínas poliubiquitiladas en K48, incorporándose con posterioridad aquéllas en K63 junto con p62 y NBR1.



**Figura 21.** AAF-cmk induce, tras dos horas, una acumulación de autofagosomas alrededor del centrosoma. Las células 143B-TK<sup>-</sup> se trataron con 50  $\mu$ M AAF-cmk y a continuación se procesaron para microscopía electrónica. Las flechas negras muestran los autofagosomas y las rojas el centrosoma. Las imágenes de la derecha muestran una ampliación de la zona señalada con un recuadro negro en las muestras tratadas con AAF-cmk. Las barras corresponden a 5  $\mu$ m en las imágenes completas y 1  $\mu$ m en las ampliaciones.

Finalmente intentamos confirmar por microscopía electrónica la presencia de autofagosomas alrededor del agresoma 2 horas después de iniciado el tratamiento. Como se aprecia en las dos imágenes de células tratadas con



50  $\mu$ M AAF-cmk mostradas en la la Figura 21, el inhibidor indujo una acumulación de autofagosomas en distinto estado de maduración (flechas negras) alrededor del centrosoma, marcado con una flecha roja, que no se observó en el control sin tratamiento.

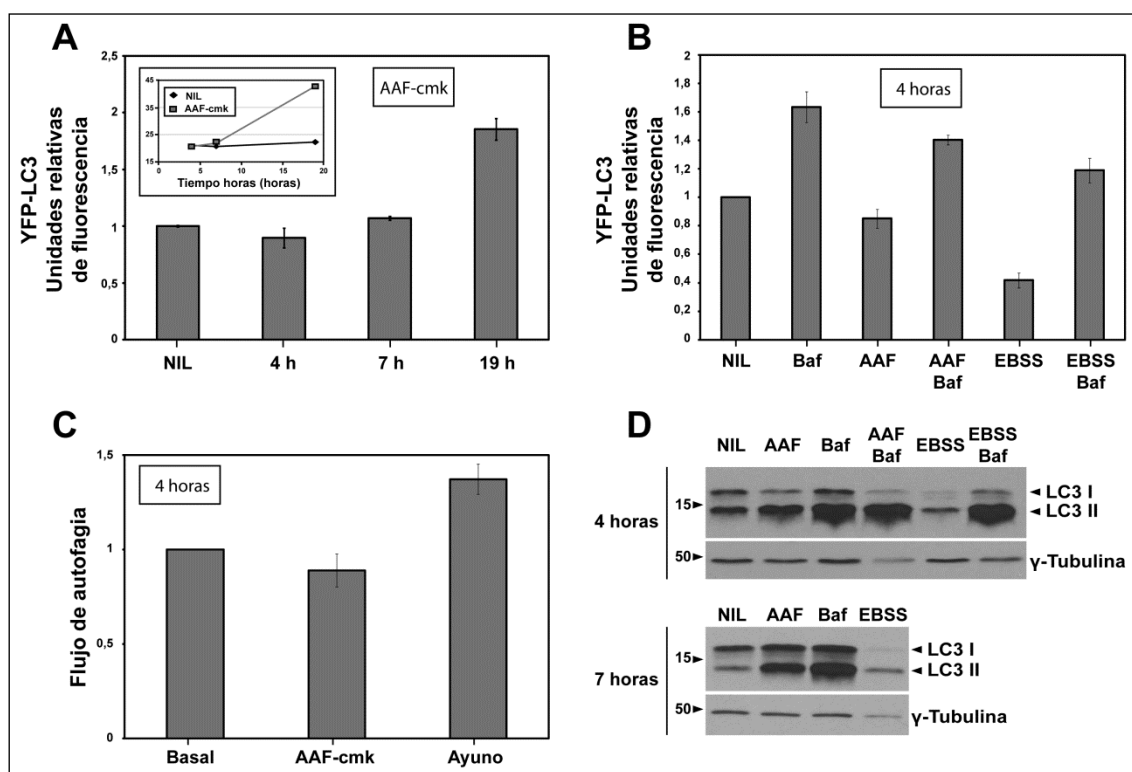
## 6.2. AAF-cmk induce la acumulación de LC3B-II

Debido a los cambios en la localización de LC3B observados, decidimos hacer una cinética a distintos tiempos para evaluar el efecto de AAF-cmk sobre este marcador midiendo los niveles de YFP-LC3B por citometría de flujo tras tratar las células 143B-TK<sup>+</sup>/EYFP-LC3B en presencia o ausencia de 50  $\mu$ M AAF-cmk. Como control de inducción del proceso, se incubaron las células en un medio en ausencia de aminoácidos que va a simular un estado de ayuno (*Earle's Balanced Salt Solution*, EBSS) y como control de inhibición, se utilizó bafilomicina, un inhibidor de la degradación en el lisosoma que resulta en el bloqueo de autofagia.

Los resultados obtenidos muestran datos diferentes dependiendo de los tiempos analizados; a tiempos cortos de tratamiento con AAF-cmk (4 horas) se produce un descenso poco significativo, pero consistente en sucesivos experimentos, de la fluorescencia del marcador en comparación con el tratamiento control. Sin embargo, a tiempos más largos (7 y 19 horas) se observa un aumento en los niveles de YFP-LC3B (Figura 22A). Si analizamos los niveles de fluorescencia en los distintos tratamientos a 4 horas, podemos observar que, como era de esperar, el tratamiento con bafilomicina causa un incremento significativo de los niveles de YFP-LC3B, mientras que la condición de ayuno hace que disminuyan (Figura 22B). La autofagia es un proceso continuo, por lo que si queremos estudiar el efecto que tiene un compuesto sobre esta vía degradativa es necesario analizar el flujo de autofagia que hay en las células en cada momento. Una forma de medir el flujo de autofagia es calcular la diferencia de la media de fluorescencia de YFP-LC3B entre un tratamiento y la combinación del mismo con bafilomicina; la diferencia de la fluorescencia entre estas dos condiciones nos da una idea de la cantidad de LC3B degradada durante el tratamiento. De esta forma podemos observar que, aunque los niveles de YFP-LC3B en presencia de AAF-cmk tras 4 horas de tratamiento disminuyan, pudiendo sugerir una inducción de la autofagia, el flujo

de autofagia respecto al flujo basal disminuye, aunque de una forma leve, sugiriendo una posible inhibición del proceso (Figura 22C).

Otra de las formas de analizar autofagia consiste en comparar, por WB, los niveles de LC3-II frente a los niveles de LC3-I. Para comprobar los datos obtenidos anteriormente, repetimos el experimento analizando los niveles de LC3B endógeno por WB. Sorprendentemente, los resultados obtenidos muestran una acumulación de LC3-II por AAF-cmk, tanto a tiempos cortos como a tiempo más largos (Figura 22D). Las diferencias que vemos en los niveles de LC3B a tiempos cortos en relación a los resultados obtenidos por fluorescencia se podrían explicar si tenemos en cuenta que los niveles de fluorescencia no siempre corresponden a los niveles de proteína total y más aún si tenemos en cuenta que en este caso la acidez del lisosoma destruye la fluorescencia de la proteína de fusión EYFP.



**Figura 22.** Efecto de AAF-cmk sobre los niveles de YFP-LC3B. (A) Cinética con 50 µM de AAF-cmk en las células 143B-TK/EYFP-LC3B; (B) Niveles de YFP-LC3B tras un tratamiento de 4 horas en distintas condiciones; (C) Flujo de autofagia calculado con los datos de (B); (D) WB mostrando los niveles de LC3B endógeno tras un tratamiento a 4 y 7 horas en distintas condiciones. Como control de carga se muestra la γ-Tubulina.

De acuerdo con lo esperable y a los resultados de citometría de flujo, el tratamiento con bafilomicina dio lugar a la acumulación de LC3B, tanto de su

forma libre como de la asociada a autofagosomas, y el ayuno a un descenso significativo de sus niveles.

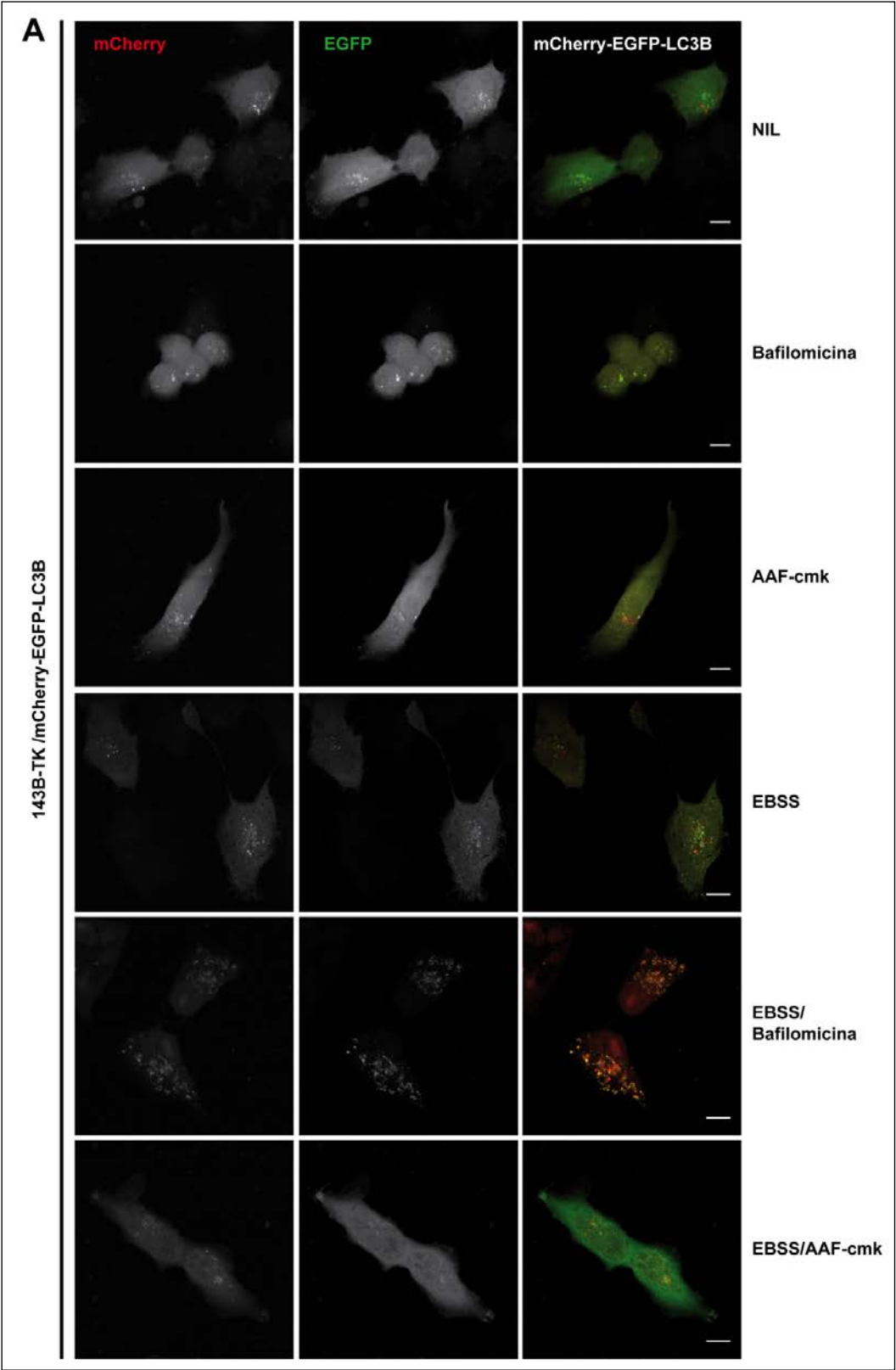
Estos resultados parecen estar sugiriendo una inhibición en el flujo de la autofagia inducida por AAF-cmk si bien no podemos confirmar el mecanismo de acción del inhibidor.

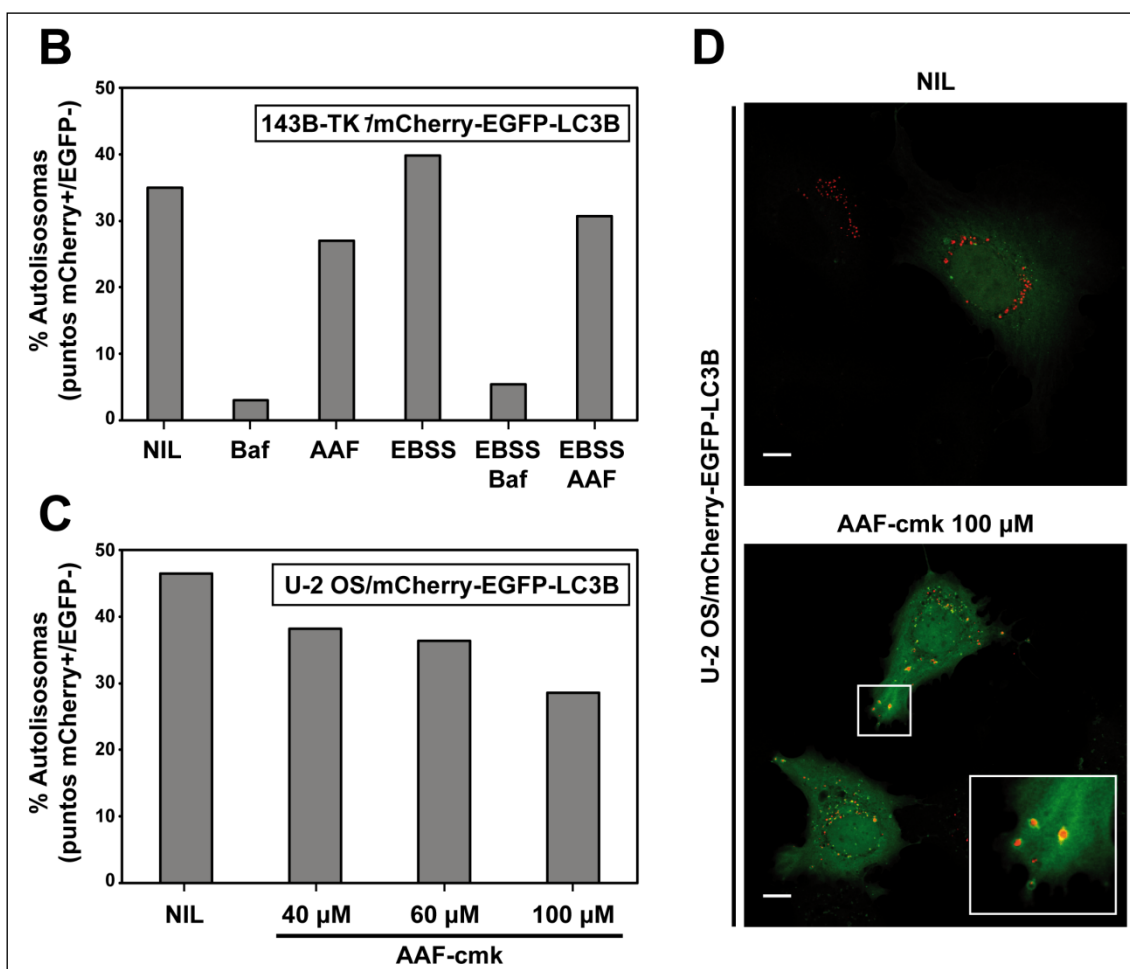
### **6.3. AAF-cmk bloquea la autofagia**

Con el objetivo de confirmar esta inhibición y evaluar el posible mecanismo por el cual AAF-cmk estaría bloqueando el flujo de autofagia, se transfectaron, de forma transitoria, las líneas celulares 143B-TK<sup>-</sup> y U-2 OS con la construcción mCherry-EGFP-LC3B. Esta construcción es muy útil para estudiar la maduración de los autofagosomas y evaluar un posible bloqueo en la fusión del autofagosoma con el lisosoma. La fluorescencia verde de la proteína de fusión EGFP es sensible a pHs ácidos por lo que se pierde cuando se acidifica el lumen de los autofagosomas al formarse los anfisomas y lisosomas. La fluorescencia roja (mCherry), por el contrario es más estable a estos valores de pH. Así, mediante experimentos de microscopía confocal, los autofagosomas se ven de color amarillo, debido a la doble fluorescencia roja y verde mientras que los autolisosomas se detectan con color solamente rojo (Pankiv et al., 2007).

En las células 143B-TK<sup>-</sup> el tratamiento con AAF-cmk (60  $\mu$ M durante 6 horas) indujo un descenso sutil en el número de autolisosomas en comparación con el tratamiento control (Figura 23A y 23B). Estos datos podrían estar sugiriendo un fallo en la fusión del autofagosoma con el lisosoma que podría explicar el bloqueo de autofagia observado en el apartado anterior. Como era de esperar, el tratamiento control con bafilomicina resulta en una caída radical de vesículas con fluorescencia solamente roja mientras que el medio EBSS tiene el efecto contrario, incrementando el porcentaje de autolisosomas. El tratamiento combinado de los inhibidores con el medio EBSS reproduce lo observado en medio completo (Figura 23B). El efecto de AAF-cmk se confirmó en los trasnfectantes de la línea U-2 OS, en los que se realizó una titulación de AAF-cmk entre 40 y 100  $\mu$ M, confirmando un descenso de autolisosomas dependiente de la concentración del inhibidor (Figura 23C). Curiosamente, en estas células el tratamiento con AAF-cmk induce la formación de unas

vesículas cuyo contenido no es fluorescente o presenta fluorescencia solamente roja, rodeadas de fluorescencia verde y roja. Estas vesículas, que estudiaremos más adelante, son de mayor tamaño que los autofagosomas observados en condiciones basales (Figura 23D).





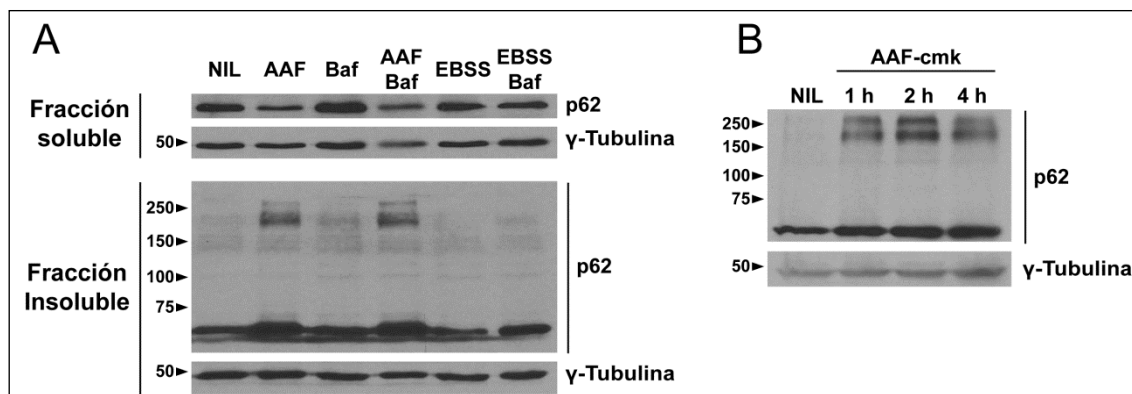
**Figura 23.** El tratamiento con AAF-cmk induce un descenso en el número de autolisosomas. (A) Las células 143B-TK<sup>-</sup> se transfectaron de forma transitoria con mCherry-EGFP-LC3B. 48 horas tras la transfección se trataron con 60  $\mu$ M AAF-cmk o bafilomicina en medio completo o EBSS. Las células se procesaron para microscopía confocal; (B) Cuantificación del porcentaje de autolisosomas en los distintos tratamientos; (C) Cuantificación del porcentaje de autolisosomas en células U-2 OS transfectadas de forma transitoria con mCherry-GFP-LC3B. Las células se trataron con concentraciones crecientes de AAF-cmk y a continuación se procesaron para microscopía confocal; (D) Imágenes características de las muestras en (C). En todos los casos las bandas corresponden a 10  $\mu$ m.

En resumen, los datos sugieren que AAF-cmk estaría interfiriendo con el flujo de autofagia, reduciendo la formación de autolisosomas.

#### 6.4. p62 se acumula en la fracción insoluble

Teniendo en cuenta que p62 se acumula en el agrosoma, el siguiente paso fue analizar, mediante WB en qué fracción (soluble o insoluble) del lisado se encuentra la proteína. Para ello se trataron células 143B-TK<sup>-</sup> con 50  $\mu$ M AAF-cmk durante cuatro horas. Como controles, se realizaron los mismos tratamientos que en el apartado anterior, bafilomicina y EBSS. Las células se

lisaron con Triton X-100 para analizar las fracciones solubles e insolubles por separado.



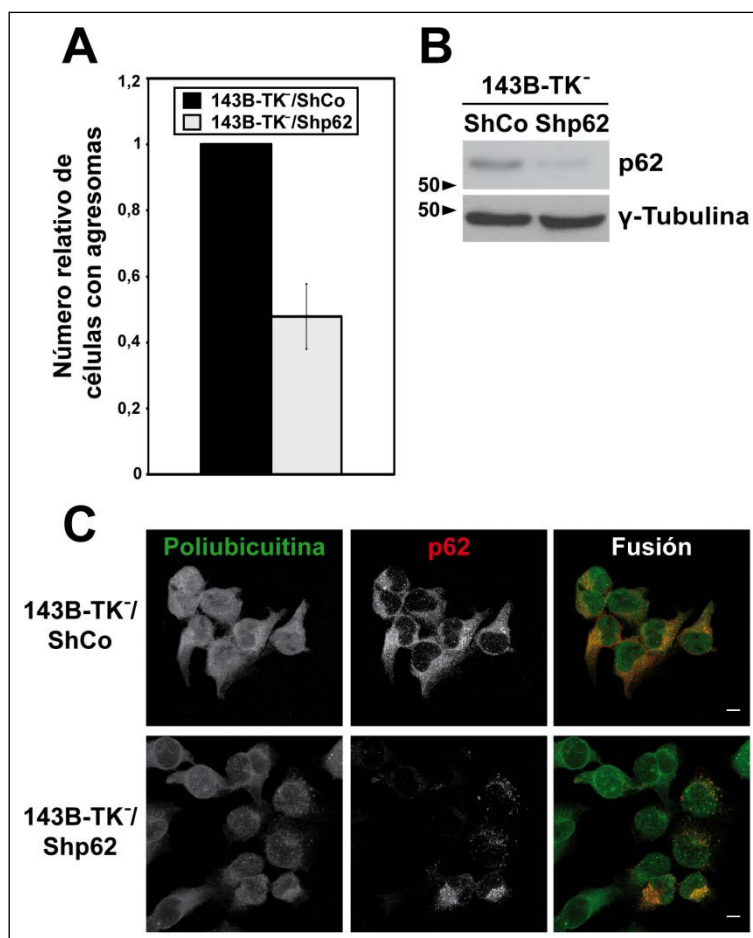
**Figura 24.** p62 se acumula en la fracción insoluble del lisado tras el tratamiento con AAF-cmk. (A) Las células 143B-TK<sup>-</sup> se trataron con 50  $\mu$ M AAF-cmk durante 4 horas y los lisados celulares se procesaron por WB separando las fracciones solubles e insolubles utilizando un tampón de lisis con Triton X-100; (B) Cinética de la acumulación de p62 en la fracción insoluble. En (A) y (B) se muestra la  $\gamma$ -Tubulina como control de carga.

Como se puede ver en la Figura 24A, el tratamiento con AAF-cmk da lugar a una disminución p62 en el sobrenadante (fracción soluble del lisado celular) mientras que los niveles de la proteína aumentan en el precipitado (fracción insoluble), algo que ocurre de forma muy rápida, como se puede observar en la Figura 24B donde los niveles de p62 aumentan de forma significativa tras una hora de incubación, que se acompaña con la aparición de formas de p62 con baja movilidad en SDS-PAGE. En el caso de los controles, no se observa un cambio en la fracción en la que se localiza p62. El tratamiento con bafilomicina origina un aumento en los niveles de p62 en la fracción soluble mientras que no se modifican en la insoluble y la incubación con el medio sin aminoácidos por el contrario no varía los niveles de la proteína en ninguna de las dos fracciones salvo una leve reducción en la fracción insoluble.

### 6.5. p62 afecta a la sensibilidad a AAF-cmk en la formación de agresomas

Con el objetivo de analizar el efecto coadyuvante que podría estar teniendo p62 en la formación de agresomas, se generó una variante de la línea 143B-TK<sup>-</sup> por silenciamiento génico mediante transducción con un vector lentiviral que expresa un RNA de interferencia de p62 (143B-TK<sup>-</sup>/Shp62), que se comparó con la línea transducida con un lentivirus control 143B-TK<sup>-</sup>/ShCo.

Para ello, se realizó una titulación de AAF-cmk (10  $\mu$ M-60  $\mu$ M) a 4 horas y los resultados se analizaron mediante inmunofluorescencia con los anticuerpos FK2 y anti-p62.



**Figura 25.** Los niveles de p62 afectan a la formación de agresomas. (A) Cuantificación del número de células que presentan agresomas tras 4 horas de tratamiento a la concentración de AAF-cmk en la que el 40-60% de las células control acumulan proteínas poliubicitiladas. La gráfica representa la media de 3 experimentos diferentes y las barras de error la desviación estándar; (B) WB de los niveles de p62 en las dos variantes celulares en el momento del experimento; (C) Figura representativa de los niveles de p62 observados por microscopía confocal. Las imágenes se tomaron sin modificar la intensidad del láser. Las barras corresponden a 10  $\mu$ m.

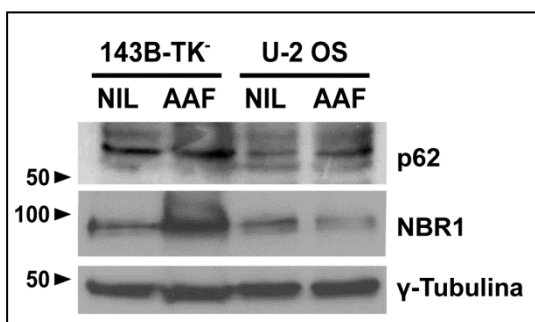
Para cada experimento, se eligieron las condiciones de AAF-cmk que eran subóptimas para la formación de agresomas en las células control, es decir, las concentraciones en las que AAF-cmk sólo indujo la formación de agresomas en un 40-60% de las células analizadas. Los resultados obtenidos muestran un efecto significativo de los niveles de expresión de p62 sobre la formación de agresomas. Así, como se muestra en la Figura 25A, la frecuencia de agresomas en las células con baja expresión de p62 fue la mitad de la

observada en la células control. En las Figuras 25B y 25C se muestran los niveles de p62 representativos de las células en el momento de realizarse los experimentos, analizados tanto por WB como por inmunofluorescencia respectivamente.

En resumen, un descenso de los niveles de p62 en las células 143B-TK<sup>-</sup> las hace más resistentes a la formación de agresomas causada por AAF-cmk.

#### 6.6. Efecto de AAF-cmk sobre los niveles de p62 y NBR1 en las líneas celulares 143B-TK<sup>-</sup> y U-2 OS

Teniendo en cuenta el papel de p62 en la formación de agresomas decidimos comprobar los niveles de p62, y el efecto de AAF-cmk sobre ellos, en las células 143B-TK<sup>-</sup> y U-2 OS, dos células que, como hemos visto en apartados anteriores, muestran una sensibilidad muy distinta a AAF-cmk y a otras fuentes de estrés proteotóxico. Para ello, tratamos las células con 100  $\mu$ M AAF-cmk durante 6 horas y analizamos las muestras por WB con anti-p62. Como se observa en la Figura 26 los niveles de p62 en los dos tipos celulares son muy diferentes, siendo menores en las células U-2 OS. En cuanto al efecto de AAF-cmk, el inhibidor induce una acumulación, poco significativa, de p62 en ambos tipos celulares.



**Figura 26.** Niveles de p62 y NBR1 en 143B-TK<sup>-</sup> y U-2 OS en presencia o ausencia de AAF-cmk. Las células se trataron con 100  $\mu$ M AAF-cmk durante 6 horas y los niveles de p62 y NBR1 se analizaron por WB. Como control de carga se muestra la  $\gamma$ -Tubulina.

A la vista de estos resultados nos propusimos analizar los niveles de NBR1, la otra proteína implicada en la selección de sustratos en la vía de autofagia. En este caso, los niveles basales de ambas líneas celulares son similares, si bien encontramos diferencias en la respuesta a AAF-cmk. Así, la línea 143B-TK<sup>-</sup> responde al inhibidor con una acumulación prominente de NBR1 mientras que en las células U-2 OS sus niveles parecen disminuir ligeramente (Figura 26).

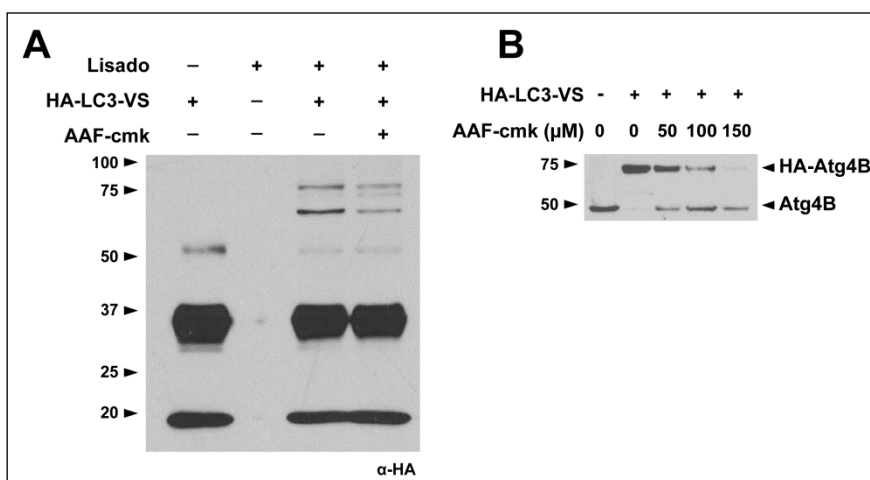
Los datos de este apartado muestran una vez más diferencias entre las dos líneas celulares, respecto a los niveles de p62 por una parte y respecto al



efecto de AAF-cmk sobre los niveles de NBR1 que son consistentes con una inhibición por AAF-cmk de la degradación de sustratos de autofagia.

### 6.7. Caracterización de Atg4B como diana de AAF-cmk

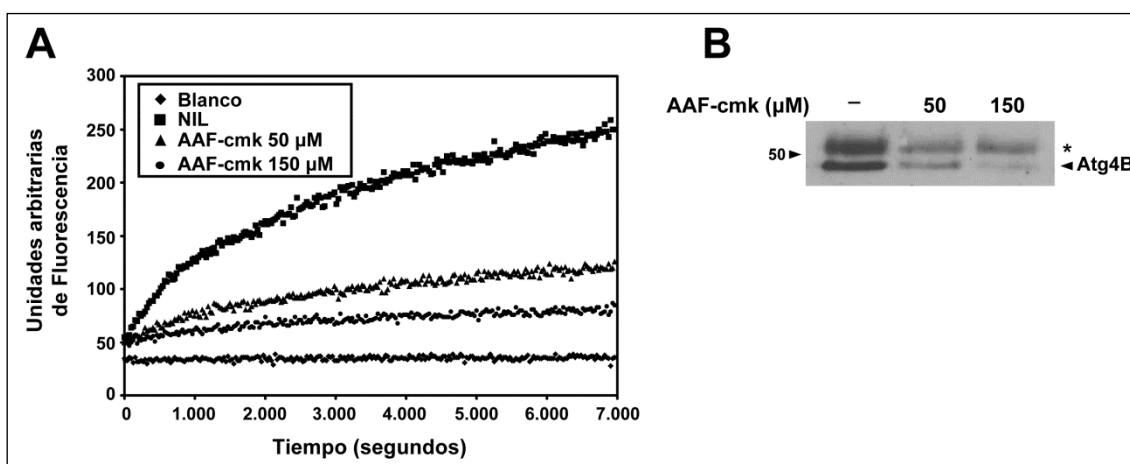
Los resultados obtenidos hasta ahora nos hicieron pensar en Atg4 como otra posible diana de AAF-cmk, dado su papel en la vía de autofagia análogo al de las DUBs en la UPS. Para abordar esta hipótesis se recurrió a una técnica muy similar a la utilizada para identificar posibles DUBs como dianas del inhibidor. Lisados celulares de 143B-TK<sup>-</sup> tratadas en presencia o ausencia de 50  $\mu$ M AAF-cmk durante dos horas se incubaron con la sonda HA-LC3-VS durante una hora a 37 °C. Esta sonda se une a Atg4 activo de la misma forma que se une la sonda HA-Ub-VS a las DUBs. El WB de las muestras revelado con anti-HA mostró un cambio en la intensidad de bandas que posteriormente comprobamos que correspondía con una inhibición, dependiente de concentración, de Atg4B, uno de los cuatro homólogos de levadura que existen en mamíferos (Figuras 27).



**Figura 27.** Atg4B se inhibe por AAF-cmk. (A) Los lisados celulares de células 143B-TK<sup>-</sup> tratadas con 50  $\mu$ M AAF-cmk durante 2 horas se incubaron con la sonda HA-LC3-VS durante 1 hora a 37 °C. Las muestras se analizaron por WB con el anticuerpo anti-HA; (B) Las células se trataron igual que en (A) analizando diferentes concentraciones de AAF-cmk. El WB se realizó con el anticuerpo anti-Atg4B.

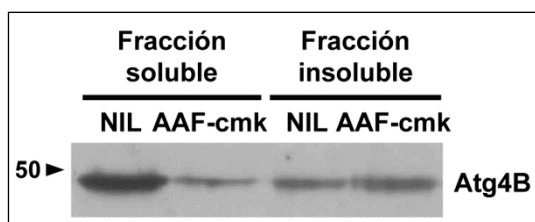
Con el objetivo de confirmar la inhibición de esta proteasa, se realizaron experimentos de actividad enzimática similares a los que se llevaron a cabo para describir la inhibición de USP7, analizando en este caso la hidrólisis del sustrato LC3-amc. Como para USP7, Atg4B se inmunoprecipitó de células tratadas en presencia o ausencia de AAF-cmk (50  $\mu$ M y 150  $\mu$ M) durante dos

horas y, a continuación se analizó la hidrólisis de LC3-amc en placas de 96 pocillos midiendo la fluorescencia cada 15 segundos. Como se muestra en la Figura 28A, el tratamiento con AAF-cmk resulta en una inhibición de la actividad de Atg4B dependiente de concentración alcanzando casi el 90% de inhibición a 150  $\mu$ M. Sin embargo, al analizar la cantidad de proteína de cada muestra por WB observamos una disminución de Atg4B en relación con la concentración de AAF-cmk (Figura 28B), lo que indudablemente incide en el resultado de actividad enzimática con el sustrato fluorogénico.



**Figura 28.** Efecto de AAF-cmk sobre la hidrólisis de LC3-amc por Atg4B. (A) Las células se trataron en presencia o ausencia de AAF-cmk (50  $\mu$ M o 150  $\mu$ M) durante dos horas. Atg4B se inmunoprecipitó y su actividad enzimática se analizó midiendo la hidrólisis de LC3-amc; (B) WB que representa la cantidad de proteína presente en las muestras analizadas en (A). El asterisco señala la cadena pesada del anticuerpo.

Este resultado, en combinación con el obtenido al analizar la inhibición de Atg4B con la sonda HA-LC3-VS, en el que a medida que aumentaba la concentración de AAF-cmk se reducía la cantidad de Atg4B (Figura 27B), nos hizo pensar que la proteína podría estar agregando en respuesta al tratamiento con AAF-cmk. Para confirmar esta hipótesis, se lisaron células 143B-TK<sup>-</sup> tratadas en presencia o ausencia de 100  $\mu$ M AAF-cmk durante dos horas con un tampón de lisis con Triton X-100, separando las fracciones soluble e insoluble. Las muestras se analizaron por WB utilizando el anticuerpo anti-Atg4B. Como se observa en la Figura 29, el inhibidor indujo un cambio en la solubilidad de Atg4B haciendo que se acumulara en la fracción insoluble del lisado, bajando los niveles significativamente en la soluble.



**Figura 29.** AAF-cmk provoca que Atg4B que se acumule en la fracción insoluble de los lisados. Células tratadas en presencia o ausencia de 100  $\mu$ M AAF-cmk durante 2 horas se lisaron con un detergente suave (2% Triton X-100) con el objetivo de fraccionar el lisado total separando el material soluble del insoluble. Las muestras se analizaron por WB utilizando un anticuerpo frente a Atg4B.

### 6.7.1. La sobreexpresión de Atg4B induce una mayor sensibilidad a AAF-cmk

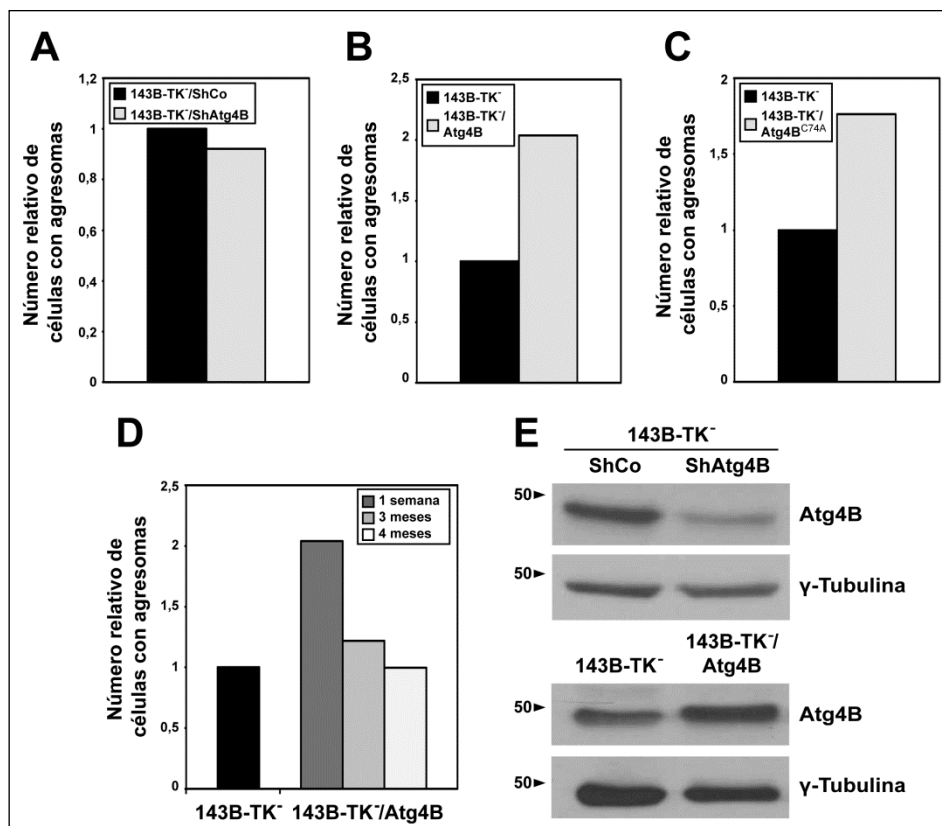
La siguiente pregunta que nos planteamos fue si los niveles de Atg4B tienen algún efecto en la formación de agresomas inducida por AAF-cmk. Para abordar esta cuestión se analizó el efecto del inhibidor sobre células 143B-TK<sup>-</sup> con distintos niveles de Atg4B.

Por una parte, se generó una línea con silenciamiento génico de Atg4B (143B-TK<sup>-</sup>/ShAtg4B) transduciendo un vector lentiviral que expresa un RNA de interferencia de Atg4B. Como control de transducción se utilizó el vector lentiviral con un shRNA control, 143B-TK<sup>-</sup>/ShCo. Por la otra se generaron dos líneas de sobreexpresión de Atg4B, una con la enzima catalíticamente activa (143B-TK<sup>-</sup>/Atg4B) y otra con la inactiva en la que se mutó la cisteína activa del centro catalítico (143B-TK<sup>-</sup>/Atg4B<sup>C74A</sup>).

Se realizaron experimentos de inmunofluorescencia con el anticuerpo FK2 en los que se trataron las distintas líneas con concentraciones crecientes de AAF-cmk (10  $\mu$ M-60  $\mu$ M) durante cuatro horas. De la misma forma que en los experimentos anteriores de este tipo, se seleccionaron las concentraciones de AAF-cmk a las cuales sólo la mitad de las células control mostraban agresomas. Como se aprecia en la Figura 30A, la disminución de los niveles de Atg4B no indujo ninguna diferencia significativa en la formación de agresomas. Sin embargo, cuando se sobreexpresó la enzima las células fueron más sensibles al inhibidor. Resulta significativo que esta mayor sensibilidad ocurriera tanto con la enzima catalíticamente activa como con la forma inactiva, aumentando hasta dos veces las células que presentaban agresomas en comparación con las células control (Figuras 30B y 30C).

En experimentos sucesivos con los transfectantes estables de la forma activa de la enzima observamos que esta elevada sensibilidad a AAF-cmk se

perdía con el tiempo, lo que podría estar sugiriendo una adaptación de las células a los nuevos niveles de proteína (Figura 30D).



**Figura 30.** Efecto de Atg4B en la formación de agresomas. (A) Cuantificación de células 143B-Tk/ShCo y 143B-Tk/ShAtg4B tratadas durante 4 horas con AAF-cmk que presentan agresomas. La concentración del inhibidor a la que se realizó el análisis fue a la que alrededor del 40-60% de las células presentaban agresomas en la muestra control; (B) y (C) Igual que (A) comparando las células 143B-TK<sup>-</sup> con 143B-TK<sup>-</sup>/Atg4B o 143B-TK<sup>-</sup>/Atg4B<sup>C74A</sup> respectivamente; (D) Comparación de las células 143B-TK<sup>-</sup>/Atg4B con agresomas a lo largo del tiempo después de la transfección; (E) WB con los niveles de Atg4B de las variantes de la línea celular utilizadas en (A) y (B).

### 6.7.2. AAF-cmk podría estar afectando al reciclaje de LC3-II

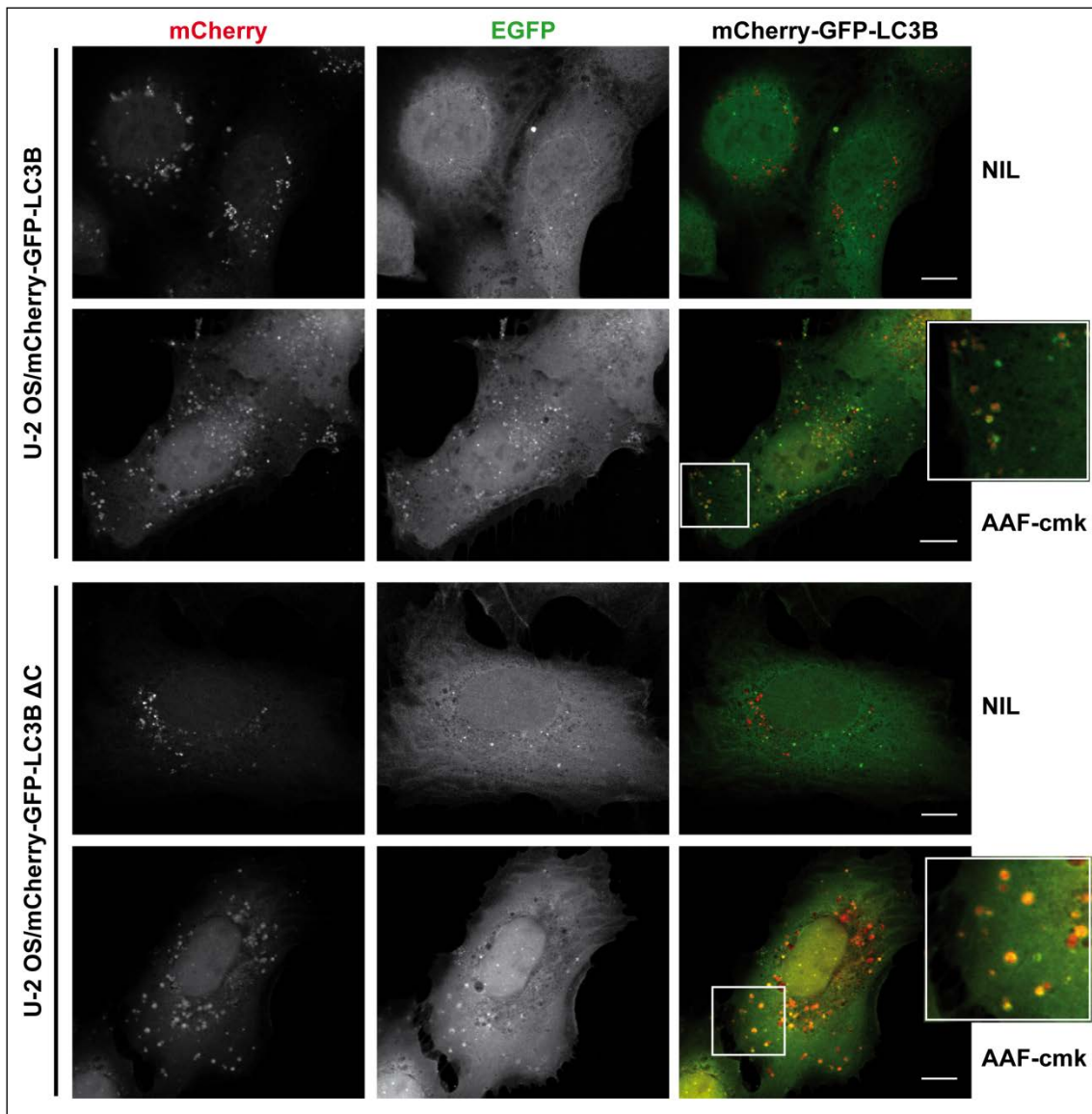
Como sugieren los datos del apartado 6.3, AAF-cmk podría estar afectando a la fusión de los autofagosomas con los lisosomas y, dado que los datos demuestran que Atg4B es una de las dianas del inhibidor, nos planteamos experimentos que pudieran esclarecer si esta inhibición es responsable del bloqueo de autofagia. Como se ha mencionado en la Introducción, Atg4 tiene un doble papel en la vía de autofagia; por un lado es la proteasa encargada de procesar el LC3 recién sintetizado dando lugar a la variante LC3-I activa. Por el otro, es el responsable de eliminar el LC3-II de la membrana externa de los autofagosomas, contribuyendo al reciclaje de LC3-I

en la célula (Kirisako et al., 2000). La ausencia de cualquiera de las dos funciones resulta en una disminución de la actividad de la autofagia (Kirisako et al., 2000; Yu et al., 2012), por lo que la inhibición de Atg4B podría estar explicando la respuesta a AAF-cmk que hemos observado.

Para analizar esta hipótesis, se transfectaron de forma transitoria las células U-2 OS con las construcciones mCherry-GFP-LC3B y su variante procesada mCherry-GFP-LC3B  $\Delta$ C. En este caso, LC3B se sintetiza como LC3-I sin tener que ser procesado por Atg4 lo que evitaría un posible déficit en los niveles de LC3-I causado por AAF-cmk, permitiendo analizar exclusivamente el efecto sobre el reciclaje de LC3-II.

48 horas tras la transfección las células se trataron en ausencia o presencia de 100  $\mu$ M AAF-cmk durante 6 horas y se procesaron para microscopía confocal.

Los resultados obtenidos (Figura 31) muestran la formación de unas vesículas, probablemente anfisomas o autolisosomas (por su ausencia de fluorescencia o fluorescencia solamente roja en su interior), en respuesta al tratamiento con AAF-cmk que se encuentran rodeadas de doble fluorescencia roja y verde, que sería compatible con un fallo en el reciclaje de LC3-II de la membrana externa de los autofagosomas. Estas vesículas aparecen tanto en las células transfectadas con la construcción salvaje como con la procesada, por tanto, aunque los resultados de los experimentos con la forma procesada de LC3B no son concluyentes, los datos obtenidos son compatibles con los efectos de una inhibición de Atg4B por AAF-cmk, si bien hay que tener en cuenta la aparente agregación de Atg4B inducida por el inhibidor, lo que estaría contribuyendo a la pérdida de función de la enzima.



**Figura 31.** AAF-cmk podría estar bloqueando el reciclaje de LC3-II. La línea celular U-2 OS se transfectó de forma transitoria con mCherry-GFP-LC3B y su variante procesada mCherry-GFP-LC3B  $\Delta C$ . 48 horas tras la transfección las células se trataron con 100  $\mu M$  AAF-cmk durante 6 horas y se procesaron para microscopía confocal. Las barras indican 10  $\mu m$ .

## 7. Sinergismo con fármacos moduladores de vías de control celular

En los resultados expuestos hasta el momento hemos comprobado que el efecto de AAF-cmk sobre las células tiene varias vertientes: 1) bloquea la actividad de USP7, lo que va a incidir sobre diversas vías de proliferación y supervivencia celular, así como de senescencia; 2) induce un estrés proteotóxico sobre las células, con incidencia diferente en distintas líneas, en parte debido a una sobrecarga de la vía UPS; 3) interfiere con la función normal de la vía de autofagia. Todos estos efectos tienen relevancia potencial en el tratamiento anti-tumoral, por afectar a vías esenciales en la supervivencia de

las células transformadas. Por ello nos planteamos la pregunta de si el efecto que AAF-cmk tiene sobre las células podría tener una potencial aplicación en terapia anti-tumoral. A la hora de evaluar nuevas vías de este tipo un aspecto que resulta crucial analizar es el sinergismo entre la nueva vía y otras de las que ya se dispone de fármacos.

La vía de señalización de la fosfatidilinositol 3 kinasa/proteína kinasa B (PI3K/Akt) es crítica en los procesos de crecimiento y supervivencia celular, afectando a la función y estabilidad de p53. La activación de PI3K conlleva la fosforilación de Mdm2 a través de Akt, translocándola al núcleo donde se va a unir a p53 impidiendo su función (Mayo and Donner, 2001). A continuación vuelve al citoplasma para mediar los procesos de ubiquitilación y degradación de p53, disminuyendo así sus niveles (Ogawara et al., 2002). Esta vía constituye una de las dianas más estudiadas en terapias contra el cáncer.

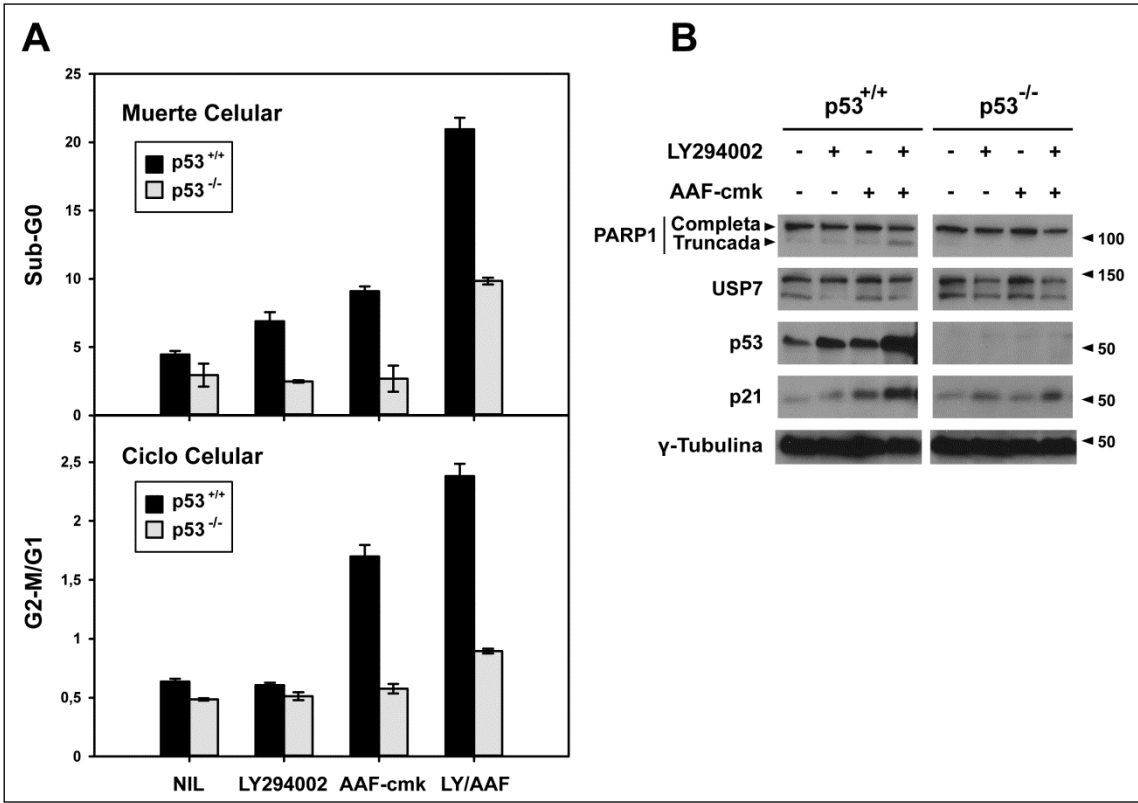
Teniendo en cuenta esto, y que AAF-cmk también afecta a la vía de p53 a través de la inhibición de USP7, quisimos evaluar el efecto de AAF-cmk, solo o en combinación con el inhibidor de la PI3K LY294002, sobre la viabilidad celular y la progresión del ciclo celular así como su dependencia de la presencia o ausencia de p53. Para ello, se incubaron durante 24 horas las células HCT116, la línea original y una derivada de ella por eliminación de los dos alelos de p53 (HCT116 p53<sup>-/-</sup>), en presencia o ausencia de 20  $\mu$ M LY294002, 100  $\mu$ M AAF-cmk, o una combinación de ambos. Las células se tiñeron con yoduro de propidio y la cantidad de DNA se analizó por citometría de flujo. A partir de los resultados obtenidos se calcularon dos parámetros; la muerte celular que se obtuvo por la fracción sub-G0 y el progreso en el ciclo que se calculó a partir del ratio G2-M/G1-G0 (Figura 32A).

En presencia de p53 ambos inhibidores, por separado, inducen muerte celular de forma similar (menos del 10% de las células se encontraban en la fracción sub-G0 comparado con el 5% de las células control) mientras que en combinación, el tratamiento con los dos inhibidores aumentó el porcentaje de las células en esta fracción hasta el 20%, sugiriendo un efecto de sinergia entre LY294002 y AAF-cmk.

En el caso de las células p53<sup>-/-</sup> no se observó ninguna respuesta frente a los dos inhibidores por separado. Sin embargo, en combinación sí se ve un



aumento en la muerte celular aunque menor que el observado en las células  $p53^{+/+}$ . Esta respuesta, independiente de  $p53$ , podría estar asociada a un sustrato de USP7 diferente de  $p53$  o bien a la inhibición de otra diana de AAF-cmk.



**Figura 32.** Sinergia entre el inhibidor de la PI3K LY294002 y AAF-cmk. (A) Efecto de los dos inhibidores, por separado o en combinación, sobre muerte y ciclo celular. Las células se trataron con 20  $\mu$ M LY294002, 100  $\mu$ M AAF-cmk, o una combinación de ambos durante 24 horas y la cantidad de DNA de las células se analizó por citometría de flujo. La gráfica muestra la media de 3 experimentos y las barras de error la desviación estándar; (B) Análisis de la bioquímica por WB de lisados celulares de células tratadas como en (A).

Los resultados obtenidos por citometría de flujo se correlacionan con los observados por WB en los que sólo se detecta el corte de PARP1 (poli-ADP-ribosa-polimerasa-1), indicador de muerte celular, en los lisados de células  $p53^{+/+}$  tratadas en combinación con los dos inhibidores (Figura 32B).

En cuanto al análisis del ciclo celular, el inhibidor de la PI3K no generó ningún cambio significativo en ninguno de los tipos celulares. Sin embargo AAF-cmk indujo un arresto de las células  $p53^{+/+}$  en G2-M. Este efecto se hizo más significativo al tratar las células con la combinación de inhibidores, lo que estaría indicando que la vía PI3K/Akt podría compensar parcialmente la pérdida



de función de USP7. Este efecto se perdió casi por completo en ausencia de p53.

De nuevo, estos resultados coinciden con los obtenidos por WB, en los que se vio una acumulación de p21 mayor en los tratamientos con AAF-cmk que en los de LY294002, aun cuando ambos inhibidores inducen una acumulación similar de p53 (Figura 32B).



## **DISCUSIÓN**



## **DISCUSIÓN**

### **1. Identificación de ubiquitín-hidrolasas como dianas de AAF-cmk**

La proteostasis es un mecanismo clave en la salud de las células. Errores en el correcto plegamiento de las proteínas, agregación de las mismas o fallos en el proceso de degradación, por defecto o por exceso contribuyen en la patogenia de muchas enfermedades humanas. Las enfermedades neurodegenerativas son un caso paradigmático de defecto proteolítico, mientras que la caquexia, frecuentemente asociada a otros procesos como el cáncer o el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, lo es de un exceso (Bence et al., 2001; Jackman and Kandarian, 2004). El defecto de la degradación proteolítica, producida por una baja actividad del proteasoma, un exceso de aporte de sustratos o por una incapacidad de degradarlos, genera una situación de estrés celular que va a dar lugar a una serie de respuestas encaminadas a solucionar o controlar esta situación adversa.

El objetivo principal de este trabajo ha consistido en la caracterización de las dianas del inhibidor AAF-cmk así como la situación de estrés que causa, de forma selectiva, en algunas células tumorales. El tratamiento con AAF-cmk induce la acumulación de proteínas poliubiquitiladas y la formación de agresomas en algunos tipos celulares como osteosarcomas o linfomas Burkitt. Este inhibidor se había identificado inicialmente como inhibidor de la TPPII, peptidasa que se encuentra sobreexpresada en células con baja actividad del proteasoma donde podría estar reemplazando, al menos en parte, a este. Datos previos en nuestro laboratorio indicaron que el efecto del inhibidor era independiente de la presencia o ausencia de TPPII, por lo que parecía descartarse como diana responsable de los efectos observados (Villasevil et al., 2010).

El mecanismo de acción que se propuso consistía en la acción de AAF-cmk sobre uno o varios reguladores de la estabilidad de sustratos de la vía UPS, siendo su efecto un aumento del flujo de éstos hacia su degradación, lo que podría conllevar a la sobrecarga de la vía en células con una capacidad casi saturada de esta, dando lugar a una situación de estrés proteotóxico que podría desembocar en un fenómeno de muerte celular (Villasevil et al., 2010).

---

La inhibición de Hsp90 provoca que muchos de sus clientes se degraden por la vía UPS (Pearl et al., 2008), lo que encajaría con el modelo propuesto. Es por ello que decidimos analizar si AAF-cmk estaba afectando a la actividad de la chaperona. Los resultados obtenidos mostraron que la inhibición de Hsp90 con derivados de la geldanamicina inducía una respuesta similar a la de AAF-cmk, si bien datos con uno de sus sustratos, GRK2, demostraron que la chaperona no era diana de AAF-cmk.

Al igual que la ubiquitilación, la desubiquitilación es un proceso altamente regulado que se ha implicado en numerosas funciones celulares, incluyendo la regulación del ciclo celular (Song and Rape, 2008), la degradación de proteínas (Guterman and Glickman, 2004; Schmidt et al., 2005; Komada, 2008), la expresión génica (Daniel and Grant, 2007), o la reparación del DNA (Kennedy and D'Andrea, 2005).

En términos generales las DUBs están afectando a la estabilidad de las proteínas, incluidos oncogenes y supresores tumorales por lo que no es de extrañar que muchas DUBs estén implicadas en la progresión del cáncer. Es por ello que las DUBs están empezando a considerarse como nuevas dianas en terapias contra este tipo de enfermedad (Daviat and Colland, 2008).

Teniendo en cuenta el hecho de que una inhibición de las DUBs favorecería la degradación de algunos sustratos, al bloquear su competición con la cascada de ubiquitilación y que, además, la actividad ubiquitín-hidrolasa también parece estar inducida en las células con baja actividad de proteasoma, consideramos que miembros de la familia de las DUBs eran candidatos a ser dianas relevantes de AAF-cmk.

Con el objetivo de abordar esta hipótesis, se utilizó una sonda covalente (HA-Ub-VS) que detecta las DUBs activas de tipo cisteín proteasa que hay en las células. Comparando la incubación de la sonda en lisados de células previamente tratadas en presencia o ausencia de AAF-cmk, identificamos algunas actividades que se inhiben por AAF-cmk, como USP7, USP14 y de forma parcial USP10.

## **2. Efecto de AAF-cmk sobre la función celular de USP7**

La inhibición de USP7 es particularmente relevante, ya que controla los niveles de p53 y de su ubiquitín ligasa Mdm2, además de otras proteínas

implicadas en el ciclo celular y respuesta al daño al DNA, ambas vías esenciales en el control de la transformación celular (Li et al., 2004).

Dada su relevancia y la existencia de sustratos bien definidos, decidimos caracterizar en detalle la inhibición de USP7. Aunque USP7 puede interaccionar tanto con p53 como con Mdm2, en condiciones normales tiene mayor afinidad por Mdm2, impidiendo su autoubicuitilación y degradación y, por tanto, induciendo la ubiquitilación de p53 y su posterior degradación (Hu et al., 2006). Cuando USP7 se inhibe, Mdm2 se desestabiliza induciendo la acumulación de p53 (Colland et al., 2009; Reverdy et al., 2012; Chauhan et al., 2012). En consonancia con estos datos, el tratamiento con AAF-cmk indujo la acumulación de p53 en células que expresan p53 salvaje mientras que no se observó ningún cambio en los niveles de la proteína en los siguientes casos: 1) células que expresan un p53 mutante que es metabólicamente estable; 2) células en las que el gen de USP7 se ha eliminado; 3) células tumorales que expresan la proteína E6 del virus del papiloma en las que p53 no está bajo el control de USP7.

Esta acumulación de p53 podría explicarse, al menos en parte, por la desestabilización de Mdm2 observada en los experimentos en combinación del inhibidor con CHX, tal y como se ha observado con otros inhibidores de USP7 descritos (Reverdy et al., 2012; Chauhan et al., 2012). El p53 acumulado en estas circunstancias es transcripcionalmente activo, como se refleja en el incremento de los niveles de p21 y en el arresto del ciclo celular en G2/M, que es consistente con este incremento (Bunz et al., 1998; Taylor and Stark, 2001). Sin embargo Reverdy y cols. (Reverdy et al., 2012) identificaron inhibidores de USP7 que, aunque también inducen acumulación de p53 y p21, causan un arresto de ciclo en G1. Esto podría deberse a que la inhibición de USP7 dé lugar a cambios conformacionales distintos con cada inhibidor, lo que podría afectar a funciones no catalíticas de USP7, como se ha descrito en el caso del control de cuerpos nucleares de PML (Sarkari et al., 2011); una explicación alternativa podría ser la muerte celular causada por el tratamiento con el inhibidor durante 24 horas en ese trabajo, algo que ya se puede apreciar tras 6 horas por fragmentación de PARP (Reverdy et al., 2012).

Es destacable que otro inhibidor de USP7 causa, en células de mieloma múltiple, un descenso de la viabilidad celular asociado a una degradación de

---

Mdm2 y acumulación de p21, aunque en este caso de forma independiente de p53 (Chauhan et al., 2012), ya que p21 se puede regular directamente por Mdm2 (Jin et al., 2003).

Tampoco podemos descartar que alguna de las otras actividades afectadas por AAF-cmk que hemos identificado, o la respuesta de estrés que puede provocar, tengan alguna influencia.

Nuestros resultados confirman por tanto la inhibición de USP7 en células tratadas con el AAF-cmk, si bien no hemos podido esclarecer si esta inhibición es responsable de la acumulación de sustratos poliubiquitilados.

### **3. Efecto de los niveles de USP14 en la formación de agresomas por AAF-cmk**

Se ha demostrado que USP14, y su homólogo en levaduras Ubp6, juegan un papel central en el control de la proteostasis celular y en la degradación de proteínas con tendencia a formar agregados. Inicialmente, el grupo de Daniel Finley demostró que Ubp6 es esencial para mantener los niveles de ubiquitina libre, al reciclar la ubiquitina asociada a los sustratos del proteasoma (Hanna et al., 2003), un proceso cuya disfunción contribuye al desarrollo de algunas patologías neuronales (Anderson et al., 2005). Se ha visto que tanto Ubp6 como USP14, debido a su asociación con el proteasoma 26S, ralentizan la degradación de sustratos por la vía UPS, algo que en levaduras no depende de la actividad catalítica de la enzima, pero que en mamíferos varía dependiendo del sustrato analizado. El motivo de esta ralentización parece ser doble: por una parte favorece el correcto procesamiento de la poliubiquitina que modifica el sustrato, y por otra daría un margen de tiempo para favorecer sistemas de control que permitan recuperar sustratos que no deberían degradarse, puesto que la acción de USP14 es previa a la “condena” definitiva de un sustrato (Hanna et al., 2006; Lee et al., 2011).

USP14 controla la degradación de diferentes proteínas, particularmente aquéllas con tendencia a formar agregados y que se asocian a enfermedades neurodegenerativas (Lee et al., 2010), acelerándose esta degradación cuando las células expresan un mutante inactivo de USP14 o cuando la forma activa se bloquea con un inhibidor específico. También se ha visto su papel en el control de la dosis de proteínas de la célula, lo que se hace patente por la alta



frecuencia de mutantes que inactivan Ubp6 en modelos de aneuploidía de levadura, mutantes que permiten la supervivencia de estas cepas aneuploides por un mecanismo que implica equilibrar, por degradación proteolítica, el desajuste proteómico producido por la anormal dosis génica (Torres et al., 2010). Estudios posteriores demuestran que cepas de levadura deficientes en Ubp6 son igual de eficientes en el ajuste del proteoma en situaciones de aneuploidía (Oromendia et al., 2012). De todos estos resultados se desprende que una inhibición de la actividad catalítica de USP14 puede favorecer la degradación de varios sustratos de la vía UPS.

En este contexto, los experimentos realizados en esta Tesis con distintas variantes de la línea celular 143B-TK<sup>-</sup> con diferentes niveles de expresión de USP14, demuestran que estos niveles condicionan la respuesta a AAF-cmk. De esta manera, la variante con una mayor expresión de la enzima presentaba una mayor resistencia al inhibidor evidenciado por una reducción del porcentaje de células con agresoma en condiciones subóptimas de AAF-cmk. En consonancia con estos resultados, la variante con una expresión mínima de USP14 mostraba mayor sensibilidad a AAF-cmk en la formación de agresomas que los controles.

Si consideramos los datos mencionados de Ubp6, nuestros resultados parecen diferir de lo esperado puesto que Ubp6, independientemente de su actividad enzimática, interfiere con la degradación de proteínas y su ausencia parece favorecer la eliminación del exceso de proteínas asociado a la aneuploidía. No obstante existen varios datos que pueden explicar, al menos parcialmente, esta aparente discrepancia. En primer lugar, en el caso de la aneuploidía en levadura, las mutaciones encontradas en Ubp6, que generan proteínas truncadas (Torres et al., 2010), mantienen la unión de esta enzima mutante al proteasoma pero impiden su actividad catalítica, dando lugar a una situación similar a la que obtenemos con la inhibición en nuestro sistema. En segundo lugar, y en el mismo modelo de levadura, se vio también que la eliminación de Ubp6 no afecta por igual a todos los modelos de duplicación cromosómica, mientras que en algunas cepas el crecimiento no se ve afectado por la eliminación de Ubp6, la duplicación de los cromosomas VIII o XI se traduce en un incremento del crecimiento mientras que las cepas en las que se duplican los cromosomas II o XIV no crecen (Torres et al., 2010); esto sugiere

---

que el efecto de Ubp6 no es universal y varía en función del sustrato afectado. Tercero, se ha visto que en células HEK 293 que sobreexpresan USP14 se acumula la proteína tau respecto a las que no lo hacen; sin embargo, cuando se expresa un mutante de USP14 catalíticamente inactivo los niveles estacionarios de esta proteína son inferiores a los de las células no transfectadas (véase la Figura 1g en Lee et al., 2010a). Estos datos sugieren que la inactivación de la actividad catalítica de USP14 favorece la degradación de esta proteína, algo acorde con los resultados presentados en esta Tesis. En cuarto lugar, en proteasomas purificados se ha observado que la unión de proteínas poliubiquitiladas activa su actividad catalítica sobre sustratos fluorogénicos, debido a la apertura del canal de acceso al núcleo catalítico del proteasoma (Bech-Otschir et al., 2009; Li and DeMartino, 2009), fenómeno mediado por la unión a Ubp6 de los sustratos poliubiquitilados (Peth et al., 2009); esta activación también ocurre cuando Ubp6 es catalíticamente inactivo. Este fenómeno podría explicar nuestros datos de sobreexpresión de USP14, al favorecer la actividad catalítica del proteasoma. Por último, en levaduras, parece que la actividad ubiquitin-hidrolasa de Ubp6 se opone a la de E3/E4 ligasa de Hul5, ambas asociadas al proteasoma, por lo que una inhibición de Ubp6/USP14 podría favorecer la ubiquitilación de sustratos asociados al proteasoma incrementando su degradación (Crosas et al., 2006).

En resumen, los resultados obtenidos sugieren que las células 143B-TK<sup>-</sup>, posiblemente debido a su condición aneuploide (Hao et al., 1999), sufren un nivel basal de estrés proteotóxico que no interfiere con su supervivencia en condiciones normales, pero que cuando se someten a una fuente de estrés adicional, como la que supone el tratamiento con AAF-cmk, la presencia USP14 puede contribuir a su resolución.

#### **4. Inducción de estrés proteotóxico por AAF-cmk**

Bajo la denominación de cáncer se incluyen procesos muy diversos que comparten una serie de características o principios comunes entre los que se encuentra el estado de estrés permanente al que están sometidas las células. Por tanto, una aproximación terapéutica lógica consistiría en sobrecargar las distintas vías de estrés proteotóxico, lo que debería afectar selectivamente a las células tumorales frente a las no transformadas. En la actualidad tanto

inhibidores de la chaperona Hsp90 (gamitrinib) como del proteasoma (bortezomib) se están utilizando como terapias en diferentes tumores. En el caso del inhibidor del proteasoma bortezomib, se ha comprobado que una de las causas que genera la muerte celular en la terapia contra el cáncer es el estrés de retículo que induce. De esta forma, la susceptibilidad a este inhibidor que presentan distintos tipos de células tumorales vendría dada por las diferencias que existen en su capacidad de responder ante una acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplasmático (Obeng et al., 2006).

Una de las diferencias que existen entre los dos tipos de osteosarcoma estudiados en esta Tesis, 143B-TK<sup>-</sup> y U-2 OS, es la susceptibilidad a AAF-cmk que presentan tanto en la formación de agregados como en la viabilidad celular. Así, la línea 143B-TK<sup>-</sup> presenta una sensibilidad mayor al inhibidor al formar agresomas a tiempos muy cortos y concentraciones más bien bajas (2 horas a 50  $\mu$ M). Estas células mueren de una forma dependiente de concentración de AAF-cmk de tal forma que si las tratamos con concentraciones altas, 150  $\mu$ M, no sobreviven más de 2 horas. Por el contrario, las U-2 OS presentan una resistencia mucho mayor resistiendo a tratamientos prolongados a concentraciones altas del inhibidor.

Poniendo todos estos datos en conjunto, la diferente respuesta al tratamiento con AAF-cmk de estas dos líneas celulares podría explicarse por una diferencia en el umbral de estrés que pueden soportar.

Es por ello que decidimos evaluar la respuesta a estrés que pudiera estar induciendo AAF-cmk sobre los dos tipos de osteosarcoma. Los resultados obtenidos muestran una fuerte inducción tanto de estrés citosólico (aumento en los niveles de Hsp70) como de retículo (activación de PERK, fosforilación de eIF2 $\alpha$  y aumento de la actividad transcripcional del promotor de CHOP) en las células 143B-TK<sup>-</sup> que no se observa en las U-2 OS. Cuando se induce un estrés de retículo más potente, empleando tunicamicina, ambas líneas celulares parecen alcanzar niveles similares de estrés (relativo a los niveles basales de cada una de ellas). Esta interpretación puede explicar el fuerte aumento de expresión de CHOP en respuesta al tratamiento con tunicamicina, que es comparable en ambas líneas. Aunque también hay que tener en cuenta que la síntesis de CHOP no está solo inducida por la vía de PERK, sino que la

---

activación de ATF6 e IRE1 también puede desencadenar la transcripción de la proteína (Oyadomari and Mori, 2004).

### **5. Efecto de AAF-cmk sobre autofagia**

Durante la respuesta a estrés, las células sufren una serie de cambios para adaptar su metabolismo y protegerse contra posibles daños. Una de las principales vías que media este tipo de cambios es la vía de autofagia, que se induce a través de distintos tipos de estrés.

La activación de PERK conlleva la fosforilación de eIF2 $\alpha$  que va a generar la inhibición en la transcripción general de proteínas. De forma selectiva se activa la transcripción de algunos genes implicados en la respuesta a estrés incluyendo ATF4 y algunos genes de autofagia (Hotamisligil, 2010). Células con un mutante de eIF2 $\alpha$  que no puede ser fosforilado son incapaces de inducir autofagia en respuesta a un estado de ayuno, sugiriendo que eIF2 $\alpha$  es un importante regulador de la vía (Kouroku et al., 2007).

El estrés oxidativo también puede activar la vía de autofagia. El peróxido de hidrógeno induce la activación de PERK (Liu et al., 2008), la inhibición de mTOR (Liu et al., 2008) y la oxidación e inactivación de Atg4, que puede jugar un papel crucial en la inducción de autofagia, promoviendo la biogénesis de los autofagosomas al estabilizar la forma lipidada de LC3 (Scherz-Shouval et al., 2007).

Por otro lado, p53 puede actuar como un regulador de la autofagia. p53 se activa en respuesta a varios tipos de estrés entre los que se encuentra el estrés oxidativo. Esta proteína puede regular la vía de autofagia tanto induciéndola como bloqueándola. Estará induciendo la autofagia a través de su actividad transcripcional e inhibiéndola a través de sus funciones citoplasmáticas (Green and Kroemer, 2009).

Teniendo en cuenta estos datos, decidimos ver si AAF-cmk tenía algún efecto sobre la vía de autofagia. En primer lugar procedimos a analizar la distribución de LC3B y p62, dos de los marcadores de autofagia utilizados para estudiar este proceso, a lo largo del tiempo en células tratadas con AAF-cmk. Curiosamente, a tiempos cortos (2 horas), p62 y LC3B se localizan alrededor del agresoma. A tiempos más largos, p62 colocaliza con las proteínas poliubiquitiladas en el agresoma, mientras que LC3B cambia su distribución y

se dispersa por el citoplasma. Como era de esperar, los dos adaptadores de reconocimiento de sustratos, p62 y NBR1, colocalizaron en todo momento (Kirkin et al., 2009a). Estos resultados podrían sugerir un fallo en el proceso de autofagia inducido por AAF-cmk debido a un error en la captación del cargo por el autofagosoma ya que LC3B se dispersa sin haber resuelto el agresoma, dejando a p62 y NBR1 colocalizando con las proteínas poliubiquitiladas.

El análisis de los datos correspondientes a los niveles de LC3B tras los distintos tratamientos (AAF-cmk, bafilomicina o condiciones de ayuno) sugieren una inhibición o bloqueo de la autofagia, ya que el tratamiento con AAF-cmk induce de forma similar a la bafilomicina un aumento en los niveles de LC3B, si bien de menor magnitud.

Este bloqueo se confirmó utilizando la construcción mCherry-EGFP-LC3B. Los distintos transfectantes analizados mostraron una disminución en el porcentaje de autolisosomas en respuesta al tratamiento con AAF-cmk, de forma dependiente de la concentración del inhibidor utilizado.

En cuanto a p62, los resultados obtenidos mediante inmunofluorescencia se confirmaron con los obtenidos por WB. El tratamiento con AAF-cmk hace que la proteína se acumule en la fracción insoluble de los lisados celulares, lo que sería esperable dada su localización en el agresoma. Estos resultados se correlacionan con datos ya descritos en la literatura en los que p62 se acumula en los agregados de proteínas que aparecen en varios modelos animales con células deficientes en autofagia (Komatsu et al., 2006). Significativamente, estos agregados desaparecen cuando p62 se elimina de estas células (Komatsu et al., 2007; Nezis et al., 2008). Es más, la pérdida de p62 consigue atenuar el daño hepático producido por la ausencia de autofagia, aunque no parece tener ningún efecto sobre la neurodegeneración (Komatsu et al., 2007). De manera similar se ha comprobado que una inhibición de autofagia provoca un mal funcionamiento de la UPS, siendo responsable de ello la acumulación de p62 que interfiere con el tráfico de sustratos al proteasoma a través de p97; reduciendo los niveles de p62 con shRNA, o sobreexpresando p97, se previene este efecto (Korolchuk et al., 2009). Algo parecido ocurre en nuestro sistema: la reducción en los niveles de p62 hace que las células 143B-TK<sup>-</sup> sean menos sensibles a AAF-cmk, reduciéndose a la mitad las células que presentan agresomas en comparación con las células con niveles de p62 normales. El

---

grupo de Keiji Tanaka (Komatsu et al., 2007) mostró, además, signos de estrés oxidativo en las células hepáticas deficientes en autofagia, efecto que consiguieron remediar al eliminar p62 de las células, señalando a p62 como un componente importante en la respuesta al estrés proteotóxico.

En resumen, el papel de p62 como “andamio” entre los sustratos de autofagia y el marcador de membrana de los autofagosomas LC3 es beneficioso para las células, garantizando el secuestro de los agregados de proteínas en agresomas o estructuras relacionadas (Clausen et al., 2010) y su posterior degradación por la vía de autofagia. Sin embargo, en determinadas condiciones en las que la autofagia se encuentra comprometida, p62 pasaría a tener un papel tóxico al inducir la agregación de proteínas poliubiquitiladas que las células no serían capaces de eliminar, comprometiendo así también la función de la vía UPS (Korolchuk et al., 2009). Este modelo sería compatible con nuestros datos, en los que observamos un bloqueo de autofagia, cuyos efectos sobre la célula se suavizan al reducir los niveles de p62.

Curiosamente, hemos observado distintos niveles de p62 en las dos líneas de osteosarcoma estudiadas, siendo significativamente más bajos en las U-2 OS (línea resistente) que en las 143B-TK<sup>-</sup> (línea sensible). No obstante, el tratamiento con AAF-cmk produce una acumulación de p62 en ambas células.

A la vista de estos resultados, decidimos evaluar los niveles de NBR1 en las dos líneas celulares y cómo se ven afectados por el tratamiento con AAF-cmk. En condiciones basales, los niveles de la proteína son similares, si bien la respuesta al inhibidor es diferente. Por un lado, NBR1 se acumula fuertemente en las células 143B-TK<sup>-</sup> mientras que los niveles en las U-2 OS disminuyen. Tanto p62 como NBR1 son sustratos de autofagia; sin embargo, mientras que p62 se puede degradar también vía UPS (Lee et al., 2012), NBR1 es sólo sensible al bloqueo de la vía lisosomal (Kirkin et al., 2009a). Estos resultados parecen sugerir diferencias entre las dos células en cuanto a los adaptadores utilizados en la respuesta de autofagia o al tráfico y reconocimiento de los sustratos de esta vía, lo que podría contribuir a la mayor sensibilidad de las 143B-TK<sup>-</sup> al inhibidor.

Los datos obtenidos hasta ahora nos hicieron pensar que Atg4 podría ser diana de AAF-cmk. Atg4 es una cisteín proteasa similar a las DUBs, que se encarga de eliminar el extremo C terminal de la proteína LC3 recién sintetizada,

produciendo LC3-I (Kirisako et al., 2000). Igual que en la ubiquitina, este procesamiento es necesario para que se lleve a cabo su anclaje a la fosfatidiletanolamina, formando LC3-II, proceso imprescindible en la formación de la doble membrana de los autofagosomas (Ichimura et al., 2000). Atg4 es, además, responsable del reciclaje de LC3-II de la membrana externa de los autofagosomas regulando así los niveles de LC3-I disponibles en la célula (Kirisako et al., 2000).

Utilizando una metodología similar a la utilizada para identificar DUBs inhibidas por AAF-cmk, confirmamos la inhibición de al menos uno de los homólogos de Atg4 de levadura, Atg4B.

Curiosamente, las estructuras obtenidas por difracción de rayos X tanto de USP7, USP14 como de Atg4B son más parecidas entre sí (Hu et al., 2002; Hu et al., 2005; Kumanomidou et al., 2006) que a otros miembros de la familia de las DUBs, lo que podría explicar por qué las tres enzimas son dianas de AAF-cmk.

Entre todos los Atg4 de mamíferos, Atg4B tiene la especificidad más amplia por los homólogos de la proteína Atg8 de levadura (Kabeya et al., 2004; Li et al., 2011). Modelos con ratones que no expresan Atg4B muestran una clara reducción en el flujo de autofagia tanto en condiciones basales como en situaciones de ayuno en todos los tejidos, reducción asociada a un incorrecto procesamiento de los ortólogos de LC3 (Marino et al., 2010).

Si bien una reducción en el flujo de autofagia podría estar ocasionando una acumulación de proteínas poliubiquitiladas, los experimentos de silenciamiento génico para Atg4B que llevamos a cabo no mostraron diferencias significativas en la formación de agresomas tras el tratamiento con AAF-cmk. Sin embargo, la sobreexpresión de la proteína hizo que el número de células con agresomas, a una misma concentración de AAF-cmk, aumentara hasta dos veces en comparación con las células control. Lo mismo ocurrió al sobreexpresar el mutante catalíticamente inactivo Atg4B<sup>C74A</sup>. El hecho de que tanto la sobreexpresión de la proteína catalíticamente activa como la inactiva tuvieran el mismo efecto sobre la formación de agresomas y la observación de que el Atg4B endógeno tienda a agregar al tratar las células con AAF-cmk, podría sugerir que no es tanto la inhibición catalítica de la proteasa como más bien un posible cambio conformacional inducido por el inhibidor que

---

hace que la proteína sea tóxica para la célula. Una explicación alternativa sería que la sobreexpresión de Atg4B, tanto en su forma activa como inactiva, inhibe la autofagia al secuestrar LC3 impidiendo su asociación a la membrana de los fagóforos, tal y como se ha descrito (Fujita et al., 2008). Si bien no podemos descartar completamente esta posibilidad, la sobreexpresión en el trabajo del grupo de Yoshimori supone una acumulación de LC3-I, y una casi total desaparición de LC3-II, algo opuesto a lo que encontramos en las células tratadas con AAF-cmk.

Con el objetivo de esclarecer el mecanismo de acción de AAF-cmk sobre la autofagia, transfectamos células con la construcción mCherry-EGFP-LC3B y su variante procesado. Los resultados obtenidos en presencia de AAF-cmk mostraron la formación de vesículas que presentan una envuelta verde y roja (aunque de menor intensidad) y un interior mayoritariamente rojo, indicativo de anfisomas o autolisosomas, lo que podría estar sugiriendo un fallo en el reciclaje del LC3B que se encuentra en la membrana externa de las vesículas. Esta observación podría explicarse por la inhibición catalítica de Atg4B por parte de AAF-cmk impidiendo la liberación de LC3B de la membrana. Este hecho es consistente con lo observado en levaduras deficientes en Atg4 y Atg8 que sobreexpresan Atg8 procesado que se acumula en la membrana de la vacuola (Nakatogawa et al., 2012; Nair et al., 2012; Yu et al., 2012). Sin embargo, el hecho de que no se observaran diferencias significativas entre los distintos transfectantes (mCherry-EGFP-LC3B y mCherry-EGFP-LC3B  $\Delta$ C) no nos permitieron confirmar este hecho. Hay que tener en cuenta que la inhibición de Atg4B es parcial a las concentraciones de AAF-cmk utilizadas en los ensayos, por lo que la actividad residual que pudiera tener la proteasa, u otras proteasas de la familia, podría ser suficiente para procesar la cantidad de LC3B de nueva síntesis o de otros homólogos del mismo. No obstante un mecanismo similar al que hemos evaluado para AAF-cmk como inhibidor de Atg4B se ha propuesto como posible inductor de la biogénesis de autofagosomas durante el ayuno (Scherz-Shouval et al., 2007; Scherz-Shouval and Elazar, 2007). Durante la respuesta de autofagia la mitocondria libera especies de oxígeno reactivas, particularmente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que oxidan de forma reversible una cisteína de Atg4 próxima al centro activo, bloqueando su actividad. El mecanismo sugiere que este bloqueo de actividad sería local, en



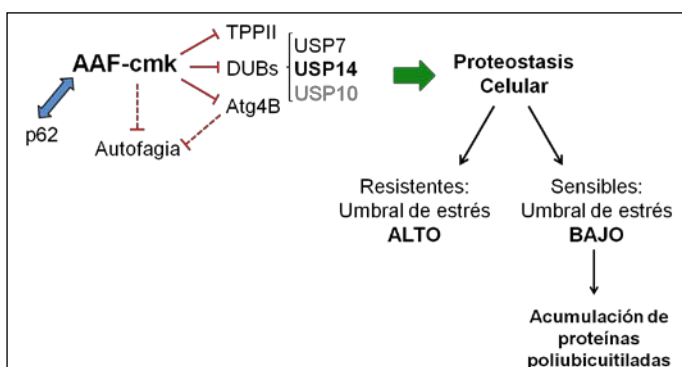
las proximidades de la mitocondria, donde se alcanzaría una concentración suficiente de  $H_2O_2$  para modificar Atg4, lo que favorecería la lipidación de LC3 y la formación del autofagosoma; en regiones más alejadas de la mitocondria Atg4 estaría completamente funcional, asegurando el reciclaje de LC3 de los autolisosomas y anfisomas, así como el correcto procesamiento de LC3 de nueva síntesis.

## **6. Posible sinergia entre AAF-cmk e inhibidores de PI3K**

Volviendo a la inducción de estrés que causa AAF-cmk sobre algunas líneas tumorales, decidimos evaluar la posibilidad de que AAF-cmk pudiera considerarse como una nueva vía de interés terapéutico contra tumores. Para ello, analizamos el sinergismo entre nuestro inhibidor y el LY294002, inhibidor de la PI3K, crítica en los procesos de crecimiento y supervivencia celular y que también afecta a la estabilidad y función de p53 (Mayo and Donner, 2001; Ogawara et al., 2002). Los resultados obtenidos mostraron una inducción tanto de arresto del ciclo celular como de muerte dependiente de p53 tras el tratamiento con AAF-cmk o con LY294002, efecto que se vio aumentado con el tratamiento combinado con los dos inhibidores, confirmando una sinergia entre ambos tratamientos. El efecto de AAF-cmk se perdió completamente en ausencia de p53. Estas células solo respondieron ante la acción combinada de los dos inhibidores, induciendo una muerte celular sutil, lo que sugiere que el efecto de AAF-cmk es más dependiente de la estabilización de p53 en el caso del arresto en ciclo que sobre la muerte celular. Por tanto, la sensibilidad de las células tumorales a varias de las vías afectadas por AAF-cmk (USP7 y sus efectos sobre p53 y Mdm2, estrés proteotóxico de citosol y de retículo endoplasmático, así como autofagia), hace que los mecanismos de acción propuestos para este inhibidor sean de utilidad en los estudios prospectivos de terapias combinadas. Si bien es cierto que el hecho de tener múltiples dianas identificadas es un problema potencial, también lo es que la falta de especificidad, con la existencia de múltiples dianas, de determinadas drogas antitumorales ha resultado ser precisamente crucial para su efectividad (Cohen and Tcherpakov, 2010).

## 7. Consideraciones finales

Dada la sensibilidad a AAF-cmk de células con baja actividad del proteasoma que sugería la acción de este inhibidor sobre la proteostasis celular, nos planteamos en el presente trabajo la identificación de dianas del inhibidor que pudieran ser significativas en este proceso, dado que habíamos descartado que su diana identificada, la TPPII, jugara algún papel en esta hipersensibilidad. Si ponemos en conjunto todos los resultados, AAF-cmk estaría actuando a diferentes niveles modulando las diferentes vías de proteólisis celular (Figura 33). Por una parte, estaría actuando sobre la vía UPS inhibiendo algunas DUBs, lo que resultaría en un aumento de los sustratos que van a ser degradados por el proteasoma así como en la ralentización de la degradación de los mismos, llevando a la sobrecarga de la vía. La inhibición de TPPII podría agravar esta situación contribuyendo al estrés generado en nuestro sistema aunque, como ya hemos dicho, no es el hecho determinante. AAF-cmk inhibe además la vía de autofagia lo que indudablemente va a contribuir a la situación de estrés proteotóxico observada, y que no todas las células son capaces de soportar, que puede estar agravado por los niveles elevados de p62, en las células más sensibles. De este modo, el mecanismo de acción de AAF-cmk que proponemos podría ser una vía interesante en la terapia contra el cáncer al inducir una acumulación de proteínas poliubiquitiladas asociada a una respuesta de estrés dependiente del tipo celular.



**Figura 33.** Nuevo modelo de acción de AAF-cmk. La inhibición de las distintas dianas de AAF-cmk (TPPII, USP7, USP14, USP10 (de forma parcial) y Atg4B) así como el bloqueo de la autofagia que se produce tras el tratamiento con el inhibidor estaría afectando a la proteostasis celular de tal forma que dependiendo del umbral de estrés de cada línea, podríamos

diferenciar dos grupos de células, uno resistente al inhibidor que se caracteriza por no mostrar una respuesta clara a AAF-cmk, al menos a tiempos cortos; y otro de células sensibles, probablemente con las vías UPS y autofagia más comprometidas, que formarían los agregados de proteínas poliubiquitiladas en forma de agrosomas.

## **CONCLUSIONES**



**CONCLUSIONES**

1. Aunque la inhibición de la chaperona Hsp90 con derivados de la geldanamicina induce una respuesta similar a la de AAF-cmk, la proteína no es una diana del inhibidor.
2. AAF-cmk afecta a la actividad de algunas DUBs como USP7, USP14 y parcialmente USP10.
3. La inhibición de USP7 por AAF-cmk resulta en una acumulación de p53 silvestre y activo que se correlaciona con una degradación de Mdm2 y una acumulación de p21. Sin embargo, no hemos podido determinar si la inhibición de USP7 es responsable o no de la formación de agresomas inducida por AAF-cmk.
4. Los niveles intracelulares de USP14 afectan a la formación de agresomas: la sobreexpresión de esta enzima incrementa la resistencia de estas células a AAF-cmk.
5. AAF-cmk induce una situación de estrés proteotóxico, tanto citosólico como de retículo, dependiente de la línea celular.
6. AAF-cmk inhibe la vía de autofagia, afectando a la localización y acumulación tanto de LC3B como de p62 y NBR1.
7. La reducción en los niveles de p62 hace que las células sean menos sensibles a AAF-cmk.
8. AAF-cmk inhibe la actividad de Atg4B y afecta a la solubilidad de la proteasa. La sobreexpresión de Atg4B (catalíticamente activo o inactivo) aumenta la sensibilidad de las células al inhibidor.
9. AAF-cmk parece interferir con el reciclaje de LC3-II, induciendo la formación de vesículas, posiblemente autolisosomas que presentan LC3B en la membrana externa.
10. AAF-cmk induce arresto del ciclo celular y muerte de forma dependiente de p53. El efecto es mayor combinando el inhibidor con el inhibidor de la vía PI3K/Akt LY294002, confirmando una sinergia entre ambos tratamientos.



## **BIBLIOGRAFÍA**





**BIBLIOGRAFÍA**

- Anckar, J. and Sistonen, L. (2011). Regulation of HSF1 Function in the Heat Stress Response: Implications in Aging and Disease. *Annual Review of Biochemistry* 80, 1089-1115.
- Anderson, C., Crimmins, S., Wilson, J.A., Korbel, G.A., Ploegh, H.L., and Wilson, S.M. (2005). Loss of Usp14 results in reduced levels of ubiquitin in ataxia mice. *J. Neurochem.* 95, 724-731.
- Antón, L.C., Schubert, U., Bacík, I., Princiotta, M.F., Wearsch, P.A., Gibbs, J., Day, P.M., Realini, C., Rechsteiner, M.C., Bennink, J.R., and Yewdell, J.W. (1999). Intracellular localization of proteasomal degradation of a viral antigen. *J. Cell Biol.* 146, 113-124.
- Antón, L.C. and Villasevil, E.M. (2008). Is there an alternative to the proteasome in cytosolic protein degradation? *Biochemical Society Transactions* 36, 839-842.
- Arendt, C.S. and Hochstrasser, M. (1997). Identification of the yeast 20S proteasome catalytic centers and subunit interactions required for active-site formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 7156-7161.
- Balch, W.E., Morimoto, R.I., Dillin, A., and Kelly, J.W. (2008). Adapting Proteostasis for Disease Intervention. *Science* 319, 916-919.
- Bar-Nun, S. and Glickman, M.H. (2012). Proteasomal AAA-ATPases: Structure and function. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* 1823, 67-82.
- Bech-Otschir, D., Helfrich, A., Enenkel, C., Consiglieri, G., Seeger, M., Holzthutter, H.G., Dahlmann, B., and Kloetzel, P.M. (2009). Polyubiquitin substrates allosterically activate their own degradation by the 26S proteasome. *Nat Struct Mol Biol* 16, 219-225.
- Bence, N.F., Sampat, R.M., and Kopito, R.R. (2001). Impairment of the Ubiquitin-Proteasome System by Protein Aggregation. *Science* 292, 1552-1555.
- Berg, T.O., Fengsrud, M., Stromhaug, P.E., Berg, T., and Seglen, P.O. (1998). Isolation and characterization of rat liver amphisomes - Evidence for fusion of autophagosomes with both early and late endosomes. *J. Biol. Chem.* 273, 21883-21892.
- Bjorkoy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Overvatn, A., Stenmark, H., and Johansen, T. (2005). p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *The Journal of Cell Biology* 171, 603-614.
- Borodovsky, A., Ovaa, H., Kolli, N., Gan-Erdene, T., Wilkinson, K.D., Ploegh, H.L., and Kessler, B.M. (2002). Chemistry-Based Functional Proteomics Reveals Novel Members of the Deubiquitinating Enzyme Family. *Chemistry & Biology* 9, 1149-1159.
- Bukau, B., Weissman, J., and Horwich, A. (2006). Molecular Chaperones and Protein Quality Control. *Cell* 125, 443-451.
- Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J.P., Sedivy, J.M., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1998). Requirement for p53 and p21 to Sustain G2 Arrest After DNA Damage. *Science* 282, 1497-1501.
- Cadwell, K. and Coscoy, L. (2005). Ubiquitination on Nonlysine Residues by a Viral E3 Ubiquitin Ligase. *Science* 309, 127-130.

- 
- Canning,M., Boutell,C., Parkinson,J., and Everett,R.D. (2004). A RING Finger Ubiquitin Ligase Is Protected from Autocatalyzed Ubiquitination and Degradation by Binding to Ubiquitin-specific Protease USP7. *J. Biol. Chem.* 279, 38160-38168.
- Chauhan,D., Tian,Z., Nicholson,B., Kumar,K.G., Zhou,B., Carrasco,R., McDermott,J.L., Leach,C.A., Fulciniti,M., Kodrasov,M.P., Weinstock,J., Kingsbury,W.D., Hideshima,T., Shah,P.K., Minvielle,S., Altun,M., Kessler,B.M., Orlowski,R., Richardson,P., Munshi,N., and Anderson,K.C. (2012). A Small Molecule Inhibitor of Ubiquitin-Specific Protease-7 Induces Apoptosis in Multiple Myeloma Cells and Overcomes Bortezomib Resistance. *Cancer Cell* 22, 345-358.
- Ciechanover,A. and Ben Saadon,R. (2004). N-terminal ubiquitination: more protein substrates join in. *Trends in Cell Biology* 14, 103-106.
- Ciechanover,A. (2012). Intracellular protein degradation: From a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* 1824, 3-13.
- Clausen,T.H., Lamark,T., Isakson,P., Finley,K., Larsen,K.B., Brech,A., Øvervatn,A., Stenmark,H., Bjørkøy,G., Simonsen,A., and Johansen,T. (2010). p62/SQSTM1 and ALFY interact to facilitate the formation of p62 bodies/ALIS and their degradation by autophagy. *Autophagy* 6, 330-344.
- Cohen,P. and Tcherpakov,M. (2010). Will the Ubiquitin System Furnish as Many Drug Targets as Protein Kinases? *Cell* 143, 686-693.
- Colland,F., Formstecher,E., Jacq,X., Reverdy,C., Planquette,C., Conrath,S., Trouplin,V., Bianchi,J., Aushev,V.N., Camonis,J., Calabrese,A., Borg-Capra,C., Sippl,W., Collura,V., Boissy,G., Rain,J.C., Guedat,P., Delansorne,R., and Daviet,L. (2009). Small-molecule inhibitor of USP7/HAUSP ubiquitin protease stabilizes and activates p53 in cells. *Mol Cancer Ther* 8, 2286-2295.
- Connell,P., Ballinger,C.A., Jiang,J., Wu,Y., Thompson,L.J., Höhfeld,J., and Patterson,C. (2001). The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nat. Cell Biol.* 3, 93-96.
- Crosas,B., Hanna,J., Kirkpatrick,D.S., Zhang,D.P., Tone,Y., Hathaway,N.A., Buecker,C., Leggett,D.S., Schmidt,M., King,R.W., Gygi,S.P., and Finley,D. (2006). Ubiquitin Chains Are Remodeled at the Proteasome by Opposing Ubiquitin Ligase and Deubiquitinating Activities. *Cell* 127, 1401-1413.
- Cummins,J.M. and Vogelstein,B. (2004). HAUSP is required for p53 destabilization. *Cell Cycle* 3, 689-692.
- Cummins,J.M., Rago,C., Kohli,M., Kinzler,K.W., Lengauer,C., and Vogelstein,B. (2004). Tumour suppression: disruption of HAUSP gene stabilizes p53. *Nature* 428, 486-1.
- Daniel,J.A. and Grant,P.A. (2007). Multi-tasking on chromatin with the SAGA coactivator complexes. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 618, 135-148.
- Daviet,L. and Colland,F. (2008). Targeting ubiquitin specific proteases for drug discovery. *Biochimie* 90, 270-283.
- Deveraux,Q., Ustrell,V., Pickart,C., and Rechsteiner,M. (1994). A 26-S Protease Subunit That Binds Ubiquitin Conjugates. *J. Biol. Chem.* 269, 7059-7061.
- Diaz-Hernandez,M., Hernandez,F., Martin-Aparicio,E., Gomez-Ramos,P., Moran,M.A., Castano,J.G., Ferrer,I., Avila,J., and Lucas,J.J. (2003). Neuronal Induction of the Immunoproteasome in Huntington's Disease. *J. Neurosci.* 23, 11653-11661.

- Dice, J.F. (2007). Chaperone-mediated autophagy. *Autophagy* 3, 295-299.
- Ebstein, F., Kloetzel, P.M., Krüger, E., and Seifert, U. (2012). Emerging roles of immunoproteasomes beyond MHC class I antigen processing. *Cellular and Molecular Life Sciences* 69, 2543-2558.
- Everett, R.D., Meredith, M., Orr, A., Cross, A., Kathoria, M., and Parkinson, J. (1997). A novel ubiquitin-specific protease is dynamically associated with the PML nuclear domain and binds to a herpesvirus regulatory protein. *EMBO Journal* 16, 566-577.
- Fenteany, G., Standaert, R.F., Lane, W.S., Choi, S., Corey, E.J., and Schreiber, S.L. (1995). Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science* 268, 726-731.
- Finley, D. (2009). Recognition and Processing of Ubiquitin-Protein Conjugates by the Proteasome. *Annual Review of Biochemistry* 78, 477-513.
- Fraile, J.M., Quesada, V., Rodriguez, D., Freije, J.M.P., and Lopez-Otín, C. (2012). Deubiquitinases in cancer: new functions and therapeutic options. *Oncogene* 31, 2373-2388.
- Fujita, N., Hayashi-Nishino, M., Fukumoto, H., Omori, H., Yamamoto, A., Noda, T., and Yoshimori, T. (2008). An Atg4B Mutant Hampers the Lipidation of LC3 Paralogues and Causes Defects in Autophagosome Closure. *Mol. Biol. Cell* 19, 4651-4659.
- Gal, J., Stroem, A.L., Kwinter, D.M., Kilty, R., Zhang, J., Shi, P., Fu, W., Wooten, M.W., and Zhu, H. (2009). Sequestosome 1/p62 links familial ALS mutant SOD1 to LC3 via an ubiquitin-independent mechanism. *Journal of Neurochemistry* 111, 1062-1073.
- García-Mata, R., Bebök, Z., Sorscher, E.J., and Sztul, E.S. (1999). Characterization and dynamics of aggresome formation by a cytosolic GFP-chimera. *J. Cell Biol.* 146, 1239-1254.
- Garcia-Mata, R., Gao, Y.S., and Sztul, E. (2002). Hassles with taking out the garbage: aggravating aggresomes. *Traffic* 3, 388-396.
- Gavioli, R., Frisan, T., Vertuani, S., Bornkamm, G.W., and Masucci, M.G. (2001). c-myc overexpression activates alternative pathways for intracellular proteolysis in lymphoma cells. *Nat. Cell Biol.* 3, 283-288.
- Geier, E., Pfeifer, G., Wilm, M., Lucchiari-Hartz, M., Baumeister, W., Eichmann, K., and Niedermann, G. (1999). A giant protease with potential to substitute for some functions of the proteasome. *Science* 283, 978-981.
- Geng, J. and Klionsky, D.J. (2008). The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. *EMBO Rep.* 9, 859-864.
- Glas, R., Bogyo, M., McMaster, J.S., Gaczynska, M., and Ploegh, H.L. (1998). A proteolytic system that compensates for loss of proteasome function. *Nature* 392, 618-622.
- Glickman, M.H. and Maytal, V. (2002). Regulating the 26S proteasome. *Curr. Top. Microbiol. Immunol* 268, 43-72.
- Glickman, M.H., Rubin, D.M., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Baumeister, W., Fried, V.A., and Finley, D. (1998a). A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell* 94, 615-623.

- 
- Glickman,M.H., Rubin,D.M., Fried,V.A., and Finley,D. (1998b). The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. *Mol. Cell. Biol.* 18, 3149-3162.
- Green,D.R. and Kroemer,G. (2009). Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature* 458, 1127-1130.
- Griffin,T.A., Nandi,D., Cruz,M., Fehling,H.J., Van Kaer,L., Monaco,J.J., and Colbert,R.A. (1998). Immunoproteasome assembly: Cooperative incorporation of interferon gamma (IFN-gamma)-inducible subunits. *J. Exp. Med.* 187, 97-104.
- Groettrup,M., Standera,S., Stohwasser,R., and Kloetzel,P.M. (1997). The subunits MECL-1 and LMP2 are mutually required for incorporation into the 20S proteasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 8970-8975.
- Groll,M., Ditzel,L., Lowe,J., Stock,D., Bochtler,M., Bartunik,H.D., and Huber,R. (1997). Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* 386, 463-471.
- Groll,M. and Huber,R. (2003). Substrate access and processing by the 20S proteasome core particle. *Int. J Biochem. Cell Biol.* 35, 606-616.
- Guterman,A. and Glickman,M.H. (2004). Deubiquitinating Enzymes are IN(Trinsic to Proteasome Function). *Current Protein and Peptide Science* 5, 201-210.
- Haas,A.L. and Rose,I.A. (1982). The Mechanism of Ubiquitin Activating Enzyme - A Kinetic and Equilibrium-Analysis. *J. Biol. Chem.* 257, 329-337.
- Hanada,T., Noda,N.N., Satomi,Y., Ichimura,Y., Fujioka,Y., Takao,T., Inagaki,F., and Ohsumi,Y. (2007). The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *J. Biol. Chem.* 282, 37298-37302.
- Hanna,J., Hathaway,N.A., Tone,Y., Crosas,B., Elsasser,S., Kirkpatrick,D.S., Leggett,D.S., Gygi,S.P., King,R.W., and Finley,D. (2006). Deubiquitinating enzyme Ubp6 functions noncatalytically to delay proteasomal degradation. *Cell* 127, 99-111.
- Hanna,J., Leggett,D.S., and Finley,D. (2003). Ubiquitin Depletion as a Key Mediator of Toxicity by Translational Inhibitors. *Mol. Cell. Biol.* 23, 9251-9261.
- Hao,H., Morrison,L.E., and Moraes,C.T. (1999). Suppression of a Mitochondrial tRNA Gene Mutation Phenotype Associated with Changes in the Nuclear. *Human Molecular Genetics* 8, 1117-1124.
- Hara,T., Nakamura,K., Matsui,M., Yamamoto,A., Nakahara,Y., Suzuki-Migishima,R., Yokoyama,M., Mishima,K., Saito,I., Okano,H., and Mizushima,N. (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441, 885-889.
- Harding,H.P., Novoa,I., Zhang,Y.H., Zeng,H.Q., Wek,R., Schapira,M., and Ron,D. (2000). Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell* 6, 1099-1108.
- He,C. and Klionsky,D.J. (2009). Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy. *Annual Review of Genetics* 43, 67-93.
- Hemelaar,J., Lelyveld,V.S., Kessler,B.M., and Ploegh,H.L. (2003). A Single Protease, Apg4B, Is Specific for the Autophagy-related Ubiquitin-like Proteins GATE-16, MAP1-LC3, GABARAP, and Apg8L. *J. Biol. Chem.* 278, 51841-51850.
- Hengstermann,A., Linares,L.K., Ciechanover,A., Whitaker,N.J., and Scheffner,M. (2001). Complete switch from Mdm2 to human papillomavirus E6-mediated degradation of p53 in cervical cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 1218-1223.

- Hershko,A. and Ciechanover,A. (1998). The ubiquitin system. *Annual Review of Biochemistry* 67, 425-479.
- Höhfeld,J., Cyr,D.M., and Patterson,C. (2001). From the cradle to the grave: molecular chaperones that may choose between folding and degradation. *EMBO Rep.* 2, 885-890.
- Hotamisligil,G.S. (2010). Endoplasmic Reticulum Stress and the Inflammatory Basis of Metabolic Disease. *Cell* 140, 900-917.
- Hu,M., Li,P., Song,L., Jeffrey,P.D., Chernova,T.A., Wilkinson,K.D., Cohen,R.E., and Shi,Y. (2005). Structure and mechanisms of the proteasome-associated deubiquitinating enzyme USP14. *EMBO J* 24, 3747-3756.
- Hu,M., Gu,L., Li,M., Jeffrey,P.D., Gu,W., and Shi,Y. (2006). Structural Basis of Competitive Recognition of p53 and MDM2 by HAUSP/USP7: Implications for the Regulation of the p53-MDM2 Pathway. *PLoS Biol* 4, e27.
- Hu,M., Li,P., Li,M., Li,W., Yao,T., Wu,J.W., Gu,W., Cohen,R.E., and Shi,Y. (2002). Crystal Structure of a UBP-Family Deubiquitinating Enzyme in Isolation and in Complex with Ubiquitin Aldehyde. *Cell* 111, 1041-1054.
- Huang,J. and Klionsky,D.J. (2007). Autophagy and human disease. *Cell Cycle* 6, 1837-1849.
- Ichimura,Y., Kirisako,T., Takao,T., Satomi,Y., Shimonishi,Y., Ishihara,N., Mizushima,N., Tanida,I., Kominami,E., Ohsumi,M., Noda,T., and Ohsumi,Y. (2000). A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* 408, 488-492.
- Ichimura,Y., Kumanomidou,T., Sou,Y.s., Mizushima,T., Ezaki,J., Ueno,T., Kominami,E., Yamane,T., Tanaka,K., and Komatsu,M. (2008). Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy. *J. Biol. Chem.* 283, 22847-22857.
- Ikeda,F., Crosetto,N., and Dikic,I. (2010). What Determines the Specificity and Outcomes of Ubiquitin Signaling? *Cell* 143, 677-681.
- Jackman,R.W. and Kandarian,S.C. (2004). The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 287, C834-C843.
- Jariel-Encontre,I., Bossis,G., and Piechaczyk,M. (2008). Ubiquitin-independent degradation of proteins by the proteasome. *Biochimica et Biophysica Acta-Reviews on Cancer* 1786, 153-177.
- Jentsch,S. (1992). The Ubiquitin-Conjugation System. *Annual Review of Genetics* 26, 179-207.
- Jin,Y., Lee,H., Zeng,S.X., Dai,M.S., and Lu,H. (2003). MDM2 promotes p21waf1/cip1 proteasomal turnover independently of ubiquitylation. *EMBO J* 22, 6365-6377.
- Johansen,T. and Lamark,T. (2011). Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy* 7, 279-296.
- Johnston,J.A., Ward,C.L., and Kopito,R.R. (1998). Aggresomes: A Cellular Response to Misfolded Proteins. *J. Cell Biol.* 143, 1883-1898.
- Ju,J.S. and Weihl,C.C. (2010). Inclusion body myopathy, Paget's disease of the bone and fronto-temporal dementia: a disorder of autophagy. *Human Molecular Genetics* 19, R38-R45.
- Kabeya,Y., Mizushima,N., Yamamoto,A., Oshitani-Okamoto,S., Ohsumi,Y., and Yoshimori,T. (2004). LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J Cell Sci* 117, 2805-2812.

- 
- Kawaguchi,Y., Kovacs,J.J., McLaurin,A., Vance,J.M., Ito,A., and Yao,T.P. (2003). The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell* 115, 727-738.
- Kennedy,R.D. and D'Andrea,A.D. (2005). The Fanconi Anemia/BRCA pathway: new faces in the crowd. *Genes & Development* 19, 2925-2940.
- Kimura,Y. and Tanaka,K. (2010). Regulatory mechanisms involved in the control of ubiquitin homeostasis. *J Biochem* 147, 793-798.
- Kirisako,T., Ichimura,Y., Okada,H., Kabeya,Y., Mizushima,N., Yoshimori,T., Ohsumi,M., Takao,T., Noda,T., and Ohsumi,Y. (2000). The Reversible Modification Regulates the Membrane-Binding State of Apg8/Aut7 Essential for Autophagy and the Cytoplasm to Vacuole Targeting Pathway. *The Journal of Cell Biology* 151, 263-276.
- Kirkin,V., Lamark,T., Sou,Y.s., Bjørkøy,G., Nunn,J.L., Bruun,J.A., Shvets,E., McEwan,D.G., Clausen,T.H., Wild,P., Bilusic,I., Theurillat,J.P., Øvervatn,A., Ishii,T., Elazar,Z., Komatsu,M., Dikic,I., and Johansen,T. (2009a). A Role for NBR1 in Autophagosomal Degradation of Ubiquitinated Substrates. *Mol Cell* 33, 505-516.
- Kirkin,V., McEwan,D.G., Novak,I., and Dikic,I. (2009b). A Role for Ubiquitin in Selective Autophagy. *Mol Cell* 34, 259-269.
- Komada,M. (2008). Controlling receptor downregulation by ubiquitination and deubiquitination. *Current drug discovery technologies* 5, 78-84.
- Komatsu,M., Waguri,S., Chiba,T., Murata,S., Iwata,J.i., Tanida,I., Ueno,T., Koike,M., Uchiyama,Y., Kominami,E., and Tanaka,K. (2006). Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 441, 880-884.
- Komatsu,M., Waguri,S., Koike,M., Sou,Y.s., Ueno,T., Hara,T., Mizushima,N., Iwata,J.i., Ezaki,J., Murata,S., Hamazaki,J., Nishito,Y., Iemura,S.i., Natsume,T., Yanagawa,T., Uwayama,J., Warabi,E., Yoshida,H., Ishii,T., Kobayashi,A., Yamamoto,M., Yue,Z., Uchiyama,Y., Kominami,E., and Tanaka,K. (2007). Homeostatic Levels of p62 Control Cytoplasmic Inclusion Body Formation in Autophagy-Deficient Mice. *Cell* 131, 1149-1163.
- Kon,M. and Cuervo,A.M. (2010). Chaperone-mediated autophagy in health and disease. *FEBS Letters* 584, 1399-1404.
- Korolchuk,V.I., Mansilla,A., Menzies,F.M., and Rubinsztein,D.C. (2009). Autophagy Inhibition Compromises Degradation of Ubiquitin-Proteasome Pathway Substrates. *Mol Cell* 33, 517-527.
- Kouroku,Y., Fujita,E., Tanida,I., Ueno,T., Isoai,A., Kumagai,H., Ogawa,S., Kaufman,R., Kominami,E., and Momoi,T. (2007). ER stress (PERK/eIF2 alpha phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell Death and Differentiation* 14, 230-239.
- Kraft,C., Peter,M., and Hofmann,K. (2010). Selective autophagy: ubiquitin-mediated recognition and beyond. *Nat Cell Biol* 12, 836-841.
- Krüger,E. and Klotzel,P.M. (2012). Immunoproteasomes at the interface of innate and adaptive immune responses: two faces of one enzyme. *Current Opinion in Immunology* 24, 77-83.
- Kuma,A., Mizushima,N., Ishihara,N., and Ohsumi,Y. (2002). Formation of the similar to 350-kDa Apg12-Apg5 center dot Apg16 multimeric complex, mediated by Apg16

- oligomerization, is essential for autophagy in yeast. *J. Biol. Chem.* 277, 18619-18625.
- Kumanomidou,T., Mizushima,T., Komatsu,M., Suzuki,A., Tanida,I., Sou,Y.s., Ueno,T., Kominami,E., Tanaka,K., and Yamane,T. (2006). The Crystal Structure of Human Atg4b, a Processing and De-conjugating Enzyme for Autophagosome-forming Modifiers. *Journal of Molecular Biology* 355, 612-618.
- Lam,Y.A., Xu,W., DeMartino,G.N., and Cohen,R.E. (1997). Editing of ubiquitin conjugates by an isopeptidase in the 26S proteasome. *Nature* 385, 737-740.
- Lamark,T., Perander,M., Outzen,H., Kristiansen,K., Overvatn,A., Michaelsen,E., Bjorkoy,G., and Johansen,T. (2003). Interaction codes within the family of mammalian Phox and Bem1p domain-containing proteins. *J. Biol. Chem.* 278, 34568-34581.
- Lamark,T. and Johansen,T. (2012). Aggrephagy: selective disposal of protein aggregates by macroautophagy. *International Journal of Cell Biology* 2012, 736905.
- Larsen,C.N. and Finley,D. (1997). Protein translocation channels in the proteasome and other proteases. *Cell* 91, 431-434.
- Lee,B.H., Lee,M.J., Park,S., Oh,D.C., Elsasser,S., Chen,P.C., Gartner,C., Dimova,N., Hanna,J., Gygi,S.P., Wilson,S.M., King,R.W., and Finley,D. (2010). Enhancement of proteasome activity by a small-molecule inhibitor of USP14. *Nature* 467, 179-184.
- Lee,J., Kim,H.R., Quinley,C., Kim,J., Gonzalez-Navajas,J., Xavier,R., and Raz,E. (2012). Autophagy Suppresses Interleukin-1 beta (IL-1 beta) Signaling by Activation of p62 Degradation via Lysosomal and Proteasomal Pathways. *J. Biol. Chem.* 287, 4033-4040.
- Lee,M.J., Lee,B.H., Hanna,J., King,R.W., and Finley,D. (2011). Trimming of ubiquitin chains by proteasome-associated deubiquitinating enzymes. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 10, R110.
- Leggett,D.S., Hanna,J., Borodovsky,A., Crosas,B., Schmidt,M., Baker,R.T., Walz,T., Ploegh,H., and Finley,D. (2002). Multiple Associated Proteins Regulate Proteasome Structure and Function. *Mol Cell* 10, 495-507.
- Levine,B. and Klionsky,D.J. (2004). Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev. Cell* 6, 463-477.
- Li,M., Hou,Y., Wang,J., Chen,X., Shao,Z.M., and Yin,X.M. (2011). Kinetics Comparisons of Mammalian Atg4 Homologues Indicate Selective Preferences toward Diverse Atg8 Substrates. *J. Biol. Chem.* 286, 7327-7338.
- Li,M., Brooks,C.L., Kon,N., and Gu,W. (2004). A Dynamic Role of HAUSP in the p53-Mdm2 Pathway. *Mol Cell* 13, 879-886.
- Li,M., Chen,D., Shiloh,A., Luo,J., Nikolaev,A.Y., Qin,J., and Gu,W. (2002). Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization. *Nature* 416, 648-653.
- Li,W., Bengtson,M.H., Ulbrich,A., Matsuda,A., Reddy,V.A., Orth,A., Chanda,S.K., Batalov,S., and Joazeiro,C.A. (2008). Genome-Wide and Functional Annotation of Human E3 Ubiquitin Ligases Identifies MULAN, a Mitochondrial E3 that Regulates the Organelle's Dynamics and Signaling. *PLoS ONE* 3.
- Li,X. and DeMartino,G.N. (2009). Variably modulated gating of the 26S proteasome by ATP and polyubiquitin. *Biochem J* 421, 397-404.

- 
- Liu,L., Wise,D.R., Diehl,J., and Simon,M. (2008). Hypoxic Reactive Oxygen Species Regulate the Integrated Stress Response and Cell Survival. *J. Biol. Chem.* 283, 31153-31162.
- Lowe,J., Stock,D., Jap,R., Zwickl,P., Baumeister,W., and Huber,R. (1995). Crystal-Structure of the 20S Proteasome from the Archaeon T-Acidophilum at 3.4-Angstrom Resolution. *Science* 268, 533-539.
- Luo,J. and Benovic,J.L. (2003). G Protein-coupled Receptor Kinase Interaction with Hsp90 Mediates Kinase Maturation. *J. Biol. Chem.* 278, 50908-50914.
- Luzio,J., Pryor,P.R., and Bright,N.A. (2007). Lysosomes: fusion and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 622-632.
- Marino,G., Fernandez,A.F., Cabrera,S., Lundberg,Y.W., Cabanillas,R., Rodriguez,F., Salvador-Montoliu,N., Vega,J.A., Germana,A., Fueyo,A., Freije,J.M., and Lopez-Otin,C. (2010). Autophagy is essential for mouse sense of balance. *Journal of Clinical Investigation* 120, 2331-2344.
- Mariño,G., Uria,J.A., Puente,X.S., Quesada,V., Bordallo,J., and López-Otín,C. (2003). Human Autophagins, a Family of Cysteine Proteinases Potentially Implicated in Cell Degradation by Autophagy. *J. Biol. Chem.* 278, 3671-3678.
- Martínez García,A. (2007). Análisis de asociación genética para el estudio de la patogénesis de la enfermedad de alzheimer. Tesis Doctoral *Universidad Autónoma de Madrid*.
- Mayo,L.D. and Donner,D.B. (2001). A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *PNAS* 98, 11598-11603.
- Medicherla,B. and Goldberg,A.L. (2008). Heat shock and oxygen radicals stimulate ubiquitin-dependent degradation mainly of newly synthesized proteins. *The Journal of Cell Biology* 182, 663-673.
- Mijaljica,D., Prescott,M., and Devenish,R.J. (2011). Microautophagy in mammalian cells Revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy* 7, 673-682.
- Mizushima,N., Kuma,A., Kobayashi,Y., Yamamoto,A., Matsubae,M., Takao,T., Natsume,T., Ohsumi,Y., and Yoshimori,T. (2003). Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J Cell Sci* 116, 1679-1688.
- Mizushima,N., Noda,T., Yoshimori,T., Tanaka,Y., Ishii,T., George,M.D., Klionsky,D.J., Ohsumi,M., and Ohsumi,Y. (1998). A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* 395, 395-398.
- Mizushima,N. (2007). Autophagy: process and function. *Genes & Development* 21, 2861-2873.
- Mizushima,N., Levine,B., Cuervo,A.M., and Klionsky,D.J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451, 1069-1075.
- Morimoto,R.I. (2008). Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging. *Genes & Development* 22, 1427-1438.
- Morimoto,R.I. (2011). The heat shock response: systems biology of proteotoxic stress in aging and disease. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 76, 91-99.
- Nair,U., Yen,W.L., Mari,M., Cao,Y., Xie,Z., Baba,M., Reggiori,F., and Klionsky,D.J. (2012). A role for Atg8-PE deconjugation in autophagosome biogenesis. *Autophagy* 8, 738-751.



- Nakatogawa,H., Ichimura,Y., and Ohsumi,Y. (2007). Atg8, a Ubiquitin-like Protein Required for Autophagosome Formation, Mediates Membrane Tethering and Hemifusion. *Cell* 130, 165-178.
- Nakatogawa,H., Ishii,J., Asai,E., and Ohsumi,Y. (2012). Atg4 recycles inappropriately lipidated Atg8 to promote autophagosome biogenesis. *Autophagy* 8, 0-9.
- Nezis,I.P., Simonsen,A., Sagona,A.P., Finley,K., Gaumer,S., Contamine,D., Rusten,T.E., Stenmark,H., and Brech,A. (2008). Ref(2)P, the *Drosophila* melanogaster homologue of mammalian p62, is required for the formation of protein aggregates in adult brain. *The Journal of Cell Biology* 180, 1065-1071.
- Nicholson,B. and Kumar,K. (2011). The Multifaceted Roles of USP7: New Therapeutic Opportunities. *Cell Biochemistry and Biophysics* 60, 61-68.
- Nijman,S.M.B., Luna-Vargas,M.P.A., Velds,A., Brummelkamp,T.R., Dirac,A.M.G., Sixma,T.K., and Bernards,R. (2005). A Genomic and Functional Inventory of Deubiquitinating Enzymes. *Cell* 123, 773-786.
- Noda,N.N., Kumeta,H., Nakatogawa,H., Satoo,K., Adachi,W., Ishii,J., Fujioka,Y., Ohsumi,Y., and Inagaki,F. (2008). Structural basis of target recognition by Atg8/LC3 during selective autophagy. *Genes to Cells* 13, 1211-1218.
- Noda,T. and Ohsumi,Y. (1998). Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J. Biol. Chem.* 273, 3963-3966.
- Obeng,E.A., Carlson,L.M., Gutman,D.M., Harrington,W.J., Lee,K.P., and Boise,L.H. (2006). Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood* 107, 4907-4916.
- Ogawara,Y., Kishishita,S., Obata,T., Isazawa,Y., Suzuki,T., Tanaka,K., Masuyama,N., and Gotoh,Y. (2002). Akt Enhances Mdm2-mediated Ubiquitination and Degradation of p53. *J. Biol. Chem.* 277, 21843-21850.
- Ohsumi,Y. (2001). Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 211-216.
- Oromendia,A.B., Dodgson,S.E., and Amon,A. (2012). Aneuploidy causes proteotoxic stress in yeast. *Genes & Development* 26, 2696-2708.
- Orvedahl,A., MacPherson,S., Sumpter,R., Jr., Talloczy,Z., Zou,Z., and Levine,B. (2010). Autophagy Protects against Sindbis Virus Infection of the Central Nervous System. *Cell Host & Microbe* 7, 115-127.
- Ottaviano,L., Schaefer,K.L., Gajewski,M., Huckenbeck,W., Baldus,S., Rogel,U., Mackintosh,C., de Alava,E., Myklebost,O., Kresse,S.H., Meza-Zepeda,L.A., Serra,M., Cleton-Jansen,A.M., Hogendoorn,P.C.W., Buerger,H., Aigner,T., Gabbert,H.E., and Poremba,C. (2010). Molecular characterization of commonly used cell lines for bone tumor research: A trans-European EuroBoNet effort. *Genes Chromosom. Cancer* 49, 40-51.
- Oyadomari,S. and Mori,M. (2004). Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death and Differentiation* 11, 381-389.
- Pankiv,S., Clausen,T.H., Lamark,T., Brech,A., Bruun,J.A., Outzen,H., Øvervatn,A., Bjørkøy,G., and Johansen,T. (2007). p62/SQSTM1 Binds Directly to Atg8/LC3 to Facilitate Degradation of Ubiquitinated Protein Aggregates by Autophagy. *J. Biol. Chem.* 282, 24131-24145.
- Pearl,L.H., Prodromou,C., and Workman,P. (2008). The Hsp90 molecular chaperone: an open and shut case for treatment. *Biochem. J.* 410, 439-453.

- 
- Peters,J.M., Franke,W.W., and Kleinschmidt,J.A. (1994). Distinct 19-S and 20-S Subcomplexes of the 26-S Proteasome and Their Distribution in the Nucleus and the Cytoplasm. *J. Biol. Chem.* 269, 7709-7718.
- Peth,A., Besche,H.C., and Goldberg,A.L. (2009). Ubiquitinated Proteins Activate the Proteasome by Binding to Usp14/Ubp6, which Causes 20S Gate Opening. *Mol Cell* 36, 794-804.
- Pickart,C.M. and Cohen,R.E. (2004). Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 177-187.
- Powers,E.T., Morimoto,R.I., Dillin,A., Kelly,J.W., and Balch,W.E. (2009). Biological and Chemical Approaches to Diseases of Proteostasis Deficiency. *Annual Review of Biochemistry* 78, 959-991.
- Princiotta,M.F., Finzi,D., Qian,S.B., Gibbs,J., Schuchmann,S., Buttgerit,F., Bennink,J.R., and Yewdell,J.W. (2003). Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing. *Immunity* 18, 343-354.
- Princiotta,M.F., Schubert,U., Chen,W., Bennink,J.R., Myung,J., Crews,C.M., and Yewdell,J.W. (2001). Cells adapted to the proteasome inhibitor 4-hydroxy- 5-iodo-3-nitrophenylacetyl-Leu-Leu-leucinal-vinyl sulfone require enzymatically active proteasomes for continued survival. *PNAS* 98, 513-518.
- Reits,E., Neijssen,J., Herberts,C., Benckhuijsen,W., Janssen,L., Drijfhout,J.W., and Neefjes,J. (2004). A Major Role for TPPII in Trimming Proteasomal Degradation Products for MHC Class I Antigen Presentation. *Immunity* 20, 495-506.
- Reverdy,C., Conrath,S., Lopez,R., Planquette,C., Atmanene,C., Collura,V., Harpon,J., Battaglia,V., Vivat,V., Sippl,W., and Colland,F. (2012). Discovery of Specific Inhibitors of Human USP7/HAUSP Deubiquitinating Enzyme. *Chemistry & Biology* 19, 467-477.
- Rivett,A.J. (1993). Proteasomes: multicatalytic proteinase complexes. *The Biochemical Journal* 291, 1-10.
- Rockel,B., Peters,J., Muller,S.A., Seyit,G., Ringler,P., Hegerl,R., Glaeser,R.M., and Baumeister,W. (2005). Molecular architecture and assembly mechanism of *Drosophila* tripeptidyl peptidase II. *PNAS* 102, 10135-10140.
- Romano,J.W., Ehrhart,J.C., Duthu,A., Kim,C.M., Appella,E., and May,P. (1989). Identification and characterization of a p53 gene mutation in a human osteosarcoma cell line. *Oncogene* 4, 1483-1488.
- Rumpf,S. and Jentsch,S. (2006). Functional Division of Substrate Processing Cofactors of the Ubiquitin-Selective Cdc48 Chaperone. *Mol Cell* 21, 261-269.
- Sahu,R., Kaushik,S., Clement,C.C., Cannizzo,E.S., Scharf,B., Follenzi,A., Potoicchio,I., Nieves,E., Cuervo,A.M., and Santambrogio,L. (2011). Microautophagy of Cytosolic Proteins by Late Endosomes. *Developmental Cell* 20, 131-139.
- Sarkari,F., Wang,X., Nguyen,T., and Frappier,L. (2011). The Herpesvirus Associated Ubiquitin Specific Protease, USP7, Is a Negative Regulator of PML Proteins and PML Nuclear Bodies. *PLoS ONE* 6, e16598.
- Scherz-Shouval,R. and Elazar,Z. (2007). ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. *Trends in Cell Biology* 17, 422-427.
- Scherz-Shouval,R., Shvets,E., Fass,E., Shorer,H., Gil,L., and Elazar,Z. (2007). Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO Journal* 26, 1749-1760.

- Schmidt,M., Hanna,J., Elsasser,S., and Finley,D. (2005). Proteasome-associated proteins: regulation of a proteolytic machine. *Biol Chem.* 386, 725-737.
- Schubert,U., Antón,L.C., Gibbs,J., Norbury,C.C., Yewdell,J.W., and Bennink,J.R. (2000). Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 404, 770-774.
- Schulte,T.W. and Neckers,L.M. (1998). The benzoquinone ansamycin 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin binds to HSP90 and shares important biologic activities with geldanamycin. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 42, 273-279.
- Seibenhener,M.L., Geetha,T., and Wooten,M.W. (2007). Sequestosome 1/p62 - More than just a scaffold. *FEBS Letters* 581, 175-179.
- Seifert,U., Bialy,L.P., Ebstein,F., Bech-Otschir,D., Voigt,A., Schröter,F., Prozorovski,T., Lange,N., Steffen,J., Rieger,M., Kuckelkorn,U., Aktas,O., Kloetzel,P.M., and Krüger,E. (2010). Immunoproteasomes Preserve Protein Homeostasis upon Interferon-Induced Oxidative Stress. *Cell* 142, 613-624.
- Shintani,T. and Klionsky,D.J. (2004). Autophagy in health and disease: A double-edged sword. *Science* 306, 990-995.
- Shpilka,T., Weidberg,H., Pietrokovski,S., and Elazar,Z. (2011). Atg8: an autophagy-related ubiquitin-like protein family. *Genome Biology* 12.
- Song,L. and Rape,M. (2008). Reverse the curse--the role of deubiquitination in cell cycle control. *Current Opinion in Cell Biology* 20, 156-163.
- Strehl,B., Seifert,U., Kruger,E., Heink,S., Kuckelkorn,U., and Kloetzel,P.M. (2005). Interferon-gamma, the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing. *Immunological Reviews* 207, 19-30.
- Taipale,M., Jarosz,D.F., and Lindquist,S. (2010). HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 515-528.
- Tan,J.M.M., Wong,E.S.P., Kirkpatrick,D.S., Pletnikova,O., Ko,H.S., Tay,S.P., Ho,M.W.L., Troncoso,J., Gygi,S.P., Lee,M.K., Dawson,V.L., Dawson,T.M., and Lim,K.L. (2008). Lysine 63-linked ubiquitination promotes the formation and autophagic clearance of protein inclusions associated with neurodegenerative diseases. *Human Molecular Genetics* 17, 431-439.
- Taylor,W.R. and Stark,G.R. (2001). Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 20, 1803-1815.
- Tomkinson,B. (1999). Tripeptidyl peptidases: enzymes that count. *Trends in Biochemical Sciences* 24, 355-359.
- Tomkinson,B. and Lindås,A.C. (2005). Tripeptidyl-peptidase II: A multi-purpose peptidase. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37, 1933-1937.
- Torres,E.M., Dephoure,N., Panneerselvam,A., Tucker,C.M., Whittaker,C.A., Gygi,S.P., Dunham,M.J., and Amon,A. (2010). Identification of Aneuploidy-Tolerating Mutations. *Cell* 143, 71-83.
- Unno,M., Mizushima,T., Morimoto,Y., Tomisugi,Y., Tanaka,K., Yasuoka,N., and Tsukihara,T. (2002). The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 angstrom resolution. *Structure* 10, 609-618.
- Verma,R., Aravind,L., Oania,R., McDonald,W.H., Yates,J.R., III, Koonin,E.V., and Deshaies,R.J. (2002). Role of Rpn11 Metalloprotease in Deubiquitination and Degradation by the 26S Proteasome. *Science* 298, 611-615.

- 
- Villasevil,E.M., Guil,S., López-Ferreras,L., Sánchez,C., Del Val,M., and Antón,L.C. (2010). Accumulation of polyubiquitylated proteins in response to Ala-Ala-Phe-chloromethylketone is independent of the inhibition of tripeptidyl peptidase II. *Biochimica et Biophysica Acta* 1803, 1094-1105.
- Wang,X., Herr,R.A., Chua,W.J., Lybarger,L., Wiertz,E.J.H.J., and Hansen,T.H. (2007). Ubiquitination of serine, threonine, or lysine residues on the cytoplasmic tail can induce ERAD of MHC-I by viral E3 ligase mK3. *The Journal of Cell Biology* 177, 613-624.
- Watanabe,Y. and Tanaka,M. (2011). p62/SQSTM1 in autophagic clearance of a non-ubiquitylated substrate. *J Cell Sci* 124, 2692-2701.
- Weidberg,H., Shvets,E., and Elazar,Z. (2011). Biogenesis and Cargo Selectivity of Autophagosomes. *Annual Review of Biochemistry* 80, 125-156.
- Welchman,R.L., Gordon,C., and Mayer,R.J. (2005). Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 599-609.
- Wenzel,T. and Baumeister,W. (1995). Conformational Constraints in Protein-Degradation by the 20S Proteasome. *Nature Structural Biology* 2, 199-204.
- Wigley,W.C., Fabunmi,R.P., Lee,M.G., Marino,C.R., Muallem,S., DeMartino,G.N., and Thomas,P.J. (1999). Dynamic association of proteasomal machinery with the centrosome. *J. Cell Biol.* 145, 481-490.
- Woodcroft,B.J., Hammond,L., Stow,J.L., and Hamilton,N.A. (2009). Automated organelle-based colocalization in whole-cell imaging. *Cytometry* 75A, 941-950.
- Xie,Z. and Klionsky,D.J. (2007). Autophagosome formation: Core machinery and adaptations. *Nature Cell Biology* 9, 1102-1109.
- Xie,Z., Nair,U., and Klionsky,D.J. (2008). Atg8 Controls Phagophore Expansion during Autophagosome Formation. *Mol. Biol. Cell* 19, 3290-3298.
- Yao,T. and Cohen,R.E. (2002). A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature* 419, 403-407.
- Young,J.C., Moarefi,I., and Hartl,F.U. (2001). Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *J Cell Biol.* 154, 267-273.
- Yu,Z.Q., Ni,T., Hong,B., Wang,H.Y., Jiang,F.J., Zou,S., Chen,Y., Zheng,X.L., Klionsky,D.J., Liang,Y., and Xie,Z. (2012). Dual roles of Atg8-PE deconjugation by Atg4 in autophagy. *Autophagy* 8, 883-892.
- Zinszner,H., Kuroda,M., Wang,X.Z., Batchvarova,N., Lightfoot,R.T., Remotti,H., Stevens,J.L., and Ron,D. (1998). CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes & Development* 12, 982-995.

## **ANEXO I**

### **Resultados obtenidos por espectrometría de masas**



## Anexo I: Resultados obtenidos por espectrometría de masas

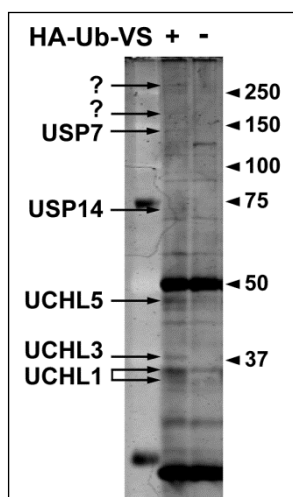


Figura S1. Imagen del gel de poliacrilamida a partir de cual se realizaron los experimentos de espectrometría de masas. Las flechas indican las proteínas identificadas en cada banda.

### • USP7

#### Protein View

Match to: **Q93009** Score: **134** Expect: **8.1e-010**

**Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7** OS=Homo sapiens GN=USP7 PE=1 SV=2

Found in search of ppw\_M10\_126778346048.txt

Nominal mass ( $M_r$ ): **129304**; Calculated pI value: **5.33**

NCBI BLAST search of [Q93009](#) against nr

Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Homo sapiens](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Variable modifications: Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Sequence Coverage: **26%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1  MNHQQQQQQQ KAGEQQQLSEP EDMEMEAGDT DDPPRITQNP VINGNVALSD
51  GHNTAEEDME DDTSWRSEAT FQFTVERFSR LSESVLSPPC FVRNLPWKIM
101 VMPRFYPDRP HQKSVGFFLQ CNAESDSTSW SCHAQAVLKI INYRDDEKSF
151 SRRISHLFFH KENDWGFSNF MAWSEVTDPE KGFIDDDKVT FEVFVQADAP
201 HGVAWDSKKH TGYVGLKNQG ATCYMNSLLQ TLFFTNQLRK AVYMMPTEGD
251 DSSKSVPLAL QRVFYELQHS DKPVGTKKLT KSFGWETLDS FMQHDVQELC
301 RVLLDNVENK MKGTCVEGTI PKLFRGKMVS YIQCKEVDYR SDRREDYYDI
351 QLSIKGKKNI FESFVDYVAV EQLDGDNKYD AGEHGLQEAE KGVKFLTLPP
401 VLHLQLMRFM YDPQTDQNIK INDRFEFPEQ LPLDEFLQKT DPKDPANYIL
451 HAVLVHSGDN HGGHYVVYLN PKGDGKWCKF DDDVVSRCTK EEAIEHNYGG
501 HDDDLSVRHC TNAYMLVYIR ESKLSEVLQA VTDHDIPQQL VERLQEEKRI
551 EAQKRKERQE AHLYMQVQIV AEDQFCGHQQ NDMYDEEKVK YTVFKVLKNS
601 SLAEFVQSLS QTMGFPQDQI RLWPMQARSN GTKRPAMLDN EADGNKTMIE
651 LSDNENPWTI FLETVDPELA ASGATLPKFD KDHDVMLFLK MYDPKTRSLN
701 YCGHIYTPIS CKIRDLLPVM CDRAGFIQDT SLLLYEEVKP NLTERIQDYD
751 VSLDKALDEL MDGDIIVFQK DDPENDNSEL PTAKEYFRDL YHRVDVIFCD
801 KTIPNDPGFV VTLSNRMNYF QVAKTVAQRL NTDPMLLQFF KSQGYRDGPG
851 NPLRHNYEGT LRDLLQFFKP RQPKLYYQQ LKMKITDFEN RRSFKCIWLN
901 SQFREEEITL YPDKHGCVRD LLEECKKAVE LGEKASGKLR LLEIVSYKII
951 GVHQEDELLE CLSPATSRTF RIEEIPLDQV DIDKENEMLV TVAHFKEVF
1001 GTFGIPLLR IHQGEHFREV MKRIQSLLDI QEKEFEKFKF AIVMMGRHQY
1051 INEDEYEVNL KDFEPQPGNM SHPRPWLGLD HFNKAPKRSR YTYLEKAIKI
1101 HN

```

---

- **USP14**

#### Protein View

Match to: **P54578** Score: **97** Expect: **4.5e-006**

**Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14 OS=Homo sapiens GN=USP14 PE=1 SV=3**

Found in search of ppw\_M11\_126778346149.txt

Nominal mass ( $M_r$ ): **56489**; Calculated pI value: **5.20**

NCBI BLAST search of [P54578](#) against nr

Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Homo sapiens](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Variable modifications: Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Sequence Coverage: **24%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

---

1	M <b>PLYSVTVKW</b>	GKEKFEGVEL	NTDEPPMVFK	<b>AQLFALTGVQ</b>	PARQKVMVKG
51	GTKDDDDWGN	IKIKNGMTLL	MMGSADALPE	EPSAKTVFVE	DMTEEQLASA
101	MELPCGLTNL	GNTCYMNATV	QCIRSVPELK	DALKRYAGAL	<b>RASGEMASAQ</b>
151	<b>YITAALRDLE</b>	<b>DSMDK</b> TSSSI	PPIILLQFLH	MAFPQFAEKG	EQGQYLQQDA
201	NECWIQMMRV	LQOKLEAIED	DSVKETDSSS	ASAATPSKKK	<b>SLIDQFFGVE</b>
251	<b>FETTMK</b> CTES	EEEEVTKGKE	NQLQLSCFIN	QEVKYLFTGL	KLRLQEEITK
301	QSPTLQRNAL	YIKSSKISRL	<b>PAYLTIQMVR</b>	FFYKEKESVN	AKVLKDVKFP
351	LMLDMYELCT	PELQEKMVSF	RSKFKDLEDK	<b>KVNQQPNTSD</b>	<b>KKSSPQKEVK</b>
401	YEPFSFADDI	GSNNCGYYDL	QAVLTHQGRS	SSSGHYVSWV	KRKQDEWIK <b>F</b>
451	<b>DDDKVSI</b> VTP	<b>EDILRLS</b> GGG	<b>DWHIAYV</b> LLY	<b>GPRRVEI</b> MEE	ESEQ

---

- **UCHL5**

#### Protein View

Match to: **Q9Y5K5** Score: **77** Expect: **0.00045**

**Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L5 OS=Homo sapiens GN=UCHL5 PE=1 SV=3**

Found in search of ppw\_M2\_126778345040.txt

Nominal mass ( $M_r$ ): **37868**; Calculated pI value: **5.23**

NCBI BLAST search of [Q9Y5K5](#) against nr

Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Homo sapiens](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Variable modifications: Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Sequence Coverage: **37%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

---

1	MTGNAGEWCL	MESDPGVFTE	LIKGFGRGA	QVEEWSLEP	ENFEK <b>LKPVH</b>
51	<b>GLIFLFKWQ</b> P	<b>GEEPAGSVVQ</b>	<b>DSRLDTIFFA</b>	<b>KQVINNACAT</b>	<b>QAIIVSVLLNC</b>
101	THQDVHLGET	LSEFK <b>EF</b> SQS	<b>FDAAMKGLAL</b>	<b>SNSDVIRQVH</b>	<b>NSFARQQMFE</b>
151	<b>FDTKTSAKEE</b>	<b>DAFHVS</b> YVP	<b>VNGRLYELDG</b>	<b>LREGPIDLGA</b>	<b>CNQDDWISAV</b>
201	RPVIEKRIQK	YSEGEIR <b>FNL</b>	<b>MAIVSDRKMI</b>	<b>YEQKIAELQR</b>	<b>QLAEEEPMDT</b>
251	DQGNMSLSAI	QSEVAKNQML	IEEEVQKLKR	YKIENIRRKH	NYLPFIMELL
301	<b>KTLAEHQQLI</b>	<b>PLVEK</b> AKEKQ	<b>NAKKAQ</b> ETK		

---



## • UCHL3

### Protein View

Match to: **P15374** Score: **164** Expect: **8.1e-013**

**Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3 OS=Homo sapiens**  
**GN=UCHL3 PE=1 SV=1**

Found in search of ppw\_M5\_126778345343.txt

Nominal mass ( $M_r$ ): **26337**; Calculated pI value: **4.84**

NCBI BLAST search of [P15374](#) against nr

Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Homo sapiens](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Variable modifications: Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Sequence Coverage: **52%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1 MEGQRWLPLE ANPEVTNQFL KQLGLHPNWQ FVDVYGM DPE LLSMVPRPVC
51 AVLLLLFPITE KYEVFRTEEE EKIKSQQQDV TSSVYFMKQT ISNACGTIGL
101 IHAIANNNKDK MHFESGSTLK KFL EESVSMS PEERARYLEN YDAIRVTHET
151 SAHEGQTEAP SIDEKVDLHF IALVHVDGHL YELDGRKPFP INHGETSDET
201 LLEDAIEVCK KFMERDPDEL RFNAIALSAA

```

## • UCHL1

### Protein View

Match to: **P09936** Score: **185** Expect: **6.5e-015**

**Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1 OS=Homo sapiens**  
**GN=UCHL1 PE=1 SV=2**

Found in search of ppw\_N4\_126778346754.txt

Nominal mass ( $M_r$ ): **25151**; Calculated pI value: **5.33**

NCBI BLAST search of [P09936](#) against nr

Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Homo sapiens](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Variable modifications: Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Sequence Coverage: **57%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1 MQLKPMEINP EMLNKVLSRL GVAGQWRFVD VLGLEEEESLG SVPAPACALL
51 LLFPLTAQHE NFRKKQIEEL KGQEVSPKVY FMKQTIGNSC GTIGLIHAVA
101 NNQDKLGFED GSVLKQFLSE TEKMSPEDRA KCFEKNEAIQ AAHDAVAQEG
151 QCRVDDKVNF HFILENNVDG HLYELDGRMP FPNVNHGASSE DTLLKDAAKV
201 CREFTEREQG EVRFSAVALC KAA

```



## **ANEXO II**

### **Publicaciones**





## Accumulation of polyubiquitylated proteins in response to Ala-Ala-Phe-chloromethylketone is independent of the inhibition of tripeptidyl peptidase II

Eugenia M. Villasevil<sup>a</sup>, Sara Guil<sup>b</sup>, Lorena López-Ferreras<sup>a</sup>, Carlos Sánchez<sup>a</sup>, Margarita Del Val<sup>a,b</sup>, Luis C. Antón<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, Consejo Superior de Investigaciones Científicas/Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, 28220 Majadahonda (Madrid), Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 9 April 2010

Received in revised form 31 May 2010

Accepted 1 June 2010

Available online 8 June 2010

#### Keywords:

Protein degradation

Proteasome

Tripeptidyl peptidase II

Aggresome

Ubiquitylation

### ABSTRACT

In the present study we have addressed the issue of proteasome independent cytosolic protein degradation. Tripeptidyl peptidase II (TPPII) has been suggested to compensate for a reduced proteasome activity, partly based on evidence using the inhibitor Ala-Ala-Phe-chloromethylketone (AAF-cmk). Here we show that AAF-cmk induces the formation of polyubiquitin-containing accumulations in osteosarcoma and Burkitt's lymphoma cell lines. These accumulations meet many of the landmarks of the aggresomes that form after proteasome inhibition. Using a combination of experiments with chemical inhibitors and interference of gene expression, we show that TPPII inhibition is not responsible for these accumulations. Our evidence suggests that the relevant target(s) is/are in the ubiquitin–proteasome pathway, most likely upstream the proteasome. We obtained evidence supporting this model by inhibition of Hsp90, which also acts upstream the proteasome. Although our data suggest that Hsp90 is not a target of AAF-cmk, its inhibition resulted in accumulations similar to those obtained with AAF-cmk. Therefore, our results question the proposed role for TPPII as a prominent alternative to the proteasome in cellular proteolysis.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Cytosolic and nuclear proteins are degraded in these compartments, mostly by the proteasome, and in the lysosome/vacuole. The proteasome is a large multisubunit, multicatalytic protease present in the cytosol and the nucleus of all eukaryotic cells; it is responsible for the degradation of short-lived proteins and polyubiquitylated substrates, and its activity is essential for cell survival [1,2]. Protein targeting by ubiquitin (Ub) is one of the signals used by the cell to label substrates for degradation by proteasomes, in a complex, highly regulated pathway commonly referred to as the ubiquitin–proteasome system (UPS) [3,4].

The products of substrate degradation by proteasomes are oligopeptides which are degraded further into single aminoacids by a series of cytosolic oligopeptidases and aminopeptidases [5]. A small fraction of these products is diverted from complete degradation and enters the

MHC class I antigen processing pathway [6]. It appears that peptides presented by MHC class I can potentially be derived from any proteolytic pathway in the cell, suggesting both proteasome-dependent and -independent pathways [7]. A crucial example of this relationship is the fact that many precursors for the antigen processing pathway come from newly synthesized proteins that are degraded either cotranslationally or shortly after translation [8–10]. This is most likely related to the nature of proteasome substrates: a significant fraction of these appears to correspond to proteins targeted for degradation shortly after translation, what has been termed DRiPs (for Defective Ribosomal Products) [10,11]. Therefore, peptide generation that is resistant to proteasome inhibitors suggests the presence of proteolytic pathways alternative to the UPS. As an example, cells with low proteasome activity, such as Burkitt's lymphoma cells [12] or cell lines adapted to proteasome inhibitors in culture [13], appear to upregulate the expression of, among other proteins, the protease tripeptidyl peptidase II (TPPII), which has been suggested to replace the proteasome in some of its functions [12,14]. As would be predicted, there are instances of MHC class I ligands that can be generated by TPPII when proteasomes are inhibited [15–17].

TPPII is a serine protease with tripeptidyl aminopeptidase activity [18] which shows a poorly characterized endoproteolytic activity [14] that requires substrates with a free N-terminus [19]. Much of the evidence linking this protease to a compensation for proteasome activity stems from the use of Ala-Ala-Phe-chloromethylketone (AAF-

**Abbreviations:** AAF-amc, Ala-Ala-Phe-7-amido-4-methylcoumarin; AAF-cmk, Ala-Ala-Phe-chloromethylketone; 17-AAG, 17-(Allylamino)-17-demethoxygeldanamycin; CHX, cycloheximide; GRK2, G protein-coupled receptor kinase 2; TPPII, tripeptidyl peptidase II; Ub, ubiquitin; UPS, ubiquitin–proteasome system

\* Corresponding author. Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” C/ Nicolás Cabrera, 1 CSIC/UAM 28049 Madrid, Spain. Tel.: +34 911 964 553; fax: +34 911 964 420.

E-mail address: [lanton@cbm.uam.es](mailto:lanton@cbm.uam.es) (L.C. Antón).

cmk), a serine protease inhibitor that completely blocks TPPII activity. As an example, cells adapted to grow in the presence of proteasome inhibitors accumulate ubiquitinated proteins in response to AAF-cmk, whereas the parental cell line is unaffected [20]. A similar situation has been observed with Burkitt's lymphoma cells when compared with Epstein–Barr virus-transformed lymphoblastoid cell lines [12]. However, AAF-cmk is not specific for TPPII, and the use of a second, more specific inhibitor, butabindide, has been hindered by its lability under standard tissue culture conditions. Stronger evidence came from studies of TPPII overexpression, which resulted in phenotypes similar to those observed in cells adapted to grow in the presence of proteasome inhibitors [21,22].

The aforementioned changes constitute a long term adaptation of the cell to a reduced proteasome activity. However, when cells are treated with proteasome inhibitors the immediate response is the accumulation of ubiquitinated proteins that cannot be degraded and, within hours, a stress response that involves the expression of both cytosolic and endoplasmic reticulum chaperones [23–25]. A fraction of the ubiquitinated proteins, particularly when the cell expresses proteins with a tendency to misfold, accumulates around the centrosome in structures termed aggresomes. These structures have a series of landmarks, such as their localization around the centrosome, the presence of ubiquitinated proteins and the recruitment of proteasomes and molecular chaperones [26–29]. They depend on retrograde transport by microtubules [26], rely on dynein [28] and histone deacetylase 6 [30] as adaptors, and require ongoing protein synthesis [31]. The latter is a critical point which goes in line with the DRiPs hypothesis, according to which inhibition of protein synthesis results in a drastic reduction in the amount of substrates of the UPS pathway. Structures related to aggresomes have been shown to play a role, probably protective, in neurodegenerative diseases that result in the accumulation of aggregated proteins, such as those containing long poly-glutamine stretches [32]. Aggresomes, and their inhibition, are also starting to be considered as potential targets for tumor therapy [33,34].

The proposed role of TPPII in compensating for the loss of proteasome activity in different situations prompted us to study whether this was occurring constitutively, and not only as a consequence of either pathological or pharmacological proteasome malfunction. We found accumulation of polyubiquitinated proteins in AAF-cmk treated cells, as well as alterations in their cellular distribution, which showed some similarities to those obtained after proteasome inhibition, including the formation of aggresome-like accumulations. However, experiments using butabindide, a more specific inhibitor of TPPII, and siRNA targeting this peptidase suggested that TPPII inhibition is not responsible for the observed effects. Our results thus suggest that the AAF-cmk-sensitive activity (or activities) that have been implicated in compensation for proteasome activity deficiency may be different from TPPII.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Protease inhibitors were obtained as follows: Ala-Ala-Phe-chloromethylketone (AAF-cmk) was from Biomol. Two proteasome inhibitors were used: epoxomicin, from either Calbiochem or Sigma, and MG132 (Cbz-Leu-Leu-Leu-OH), from either Sigma or Biomol. Butabindide was from Tocris. Nocodazole, 17-(Allylamino)-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) and cycloheximide (CHX) were from Sigma. Sources of primary antibodies were as follows: mouse monoclonal antibodies FK1 and FK2 against ubiquitinated proteins (IgM and IgG1, respectively), and rabbit anti-proteasome (PW8155) were from Biomol; rat monoclonal anti-Hsp90 (SPA-835) from Stressgen; rabbit anti-GFP (A-6455) from Invitrogen; rabbit anti-GRK2 (sc-562) from Santa Cruz Biotechnology; rabbit anti-histone H2A (07-146) from Millipore; and mouse monoclonal anti- $\gamma$ -tubulin (T6557) and rabbit anti-Ub (U5379) from Sigma. Goat secondary

antibodies coupled to Alexa Fluor dyes were from Invitrogen. Horseradish peroxidase-coupled secondary antibodies were from Southern Biotech. Magic Mark molecular weight markers and Precision Plus Protein Standards were from Invitrogen and Bio-Rad, respectively. The fluorogenic substrates used in the assays of proteolytic activity were: Ala-Ala-Phe-7-amido-4-methylcoumarin (AAF-amc) for TPPII activity and Cbz-Gly-Gly-Leu-7-amido-4-methylcoumarin (zGGL-amc) for the chymotryptic-like activity of the proteasome, both from Calbiochem. 20S proteasomes were purified from HeLa S3 as previously described [35].

### 2.2. Cell lines, culture conditions and treatments with inhibitors

Most of the experiments were carried out with the human osteosarcoma cell line 143B-TK<sup>-</sup>. Cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), or RPMI for the Daudi cell line, supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100  $\mu$ g/ml streptomycin. Epoxomicin and MG132 were used at 1–2  $\mu$ M and 5–20  $\mu$ M, respectively. AAF-cmk was used at 20–60  $\mu$ M, except where indicated; due to variability between stocks, we systematically titrated every vial after dissolving in DMSO, using for subsequent experiments the lowest inhibitor concentration that induced Ub-containing perinuclear aggregates in at least 90–95% of the cells. Treatments with butabindide were performed as described [19]. All inhibitor stocks were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  and used within two weeks. Cycloheximide was used at concentrations ranging between 25 and 250  $\mu$ M with similar results.

### 2.3. Plasmid constructs and transfections

Ubiquitin fused to the C-terminus of EGFP (EGFP-Ub) [36] was a gift from Jonathan Yewdell and Jack Bennink (NIH, Bethesda, MD, USA). EGFP fused to a C-degron (EGFP-CL1) was used as a model UPS substrate; this fusion protein is degraded rapidly by this pathway, resulting in a short half-life [37]; as a result it is expressed at low levels in transfected cells and accumulates upon proteasome inhibition. Transfections were carried out in 143B-TK<sup>-</sup> cells with Eugene 6 (Roche), and stable transfectants were selected using G418 at 350  $\mu$ g/ml, and then cloned by limiting dilution. Flow cytometry was used for the selection of EGFP-CL1 clones with low basal fluorescence that significantly increased upon treatment with epoxomicin.

### 2.4. Live cell assay of the stability of an ubiquitin–proteasome substrate

143B-TK<sup>-</sup> cells ( $3 \times 10^5$ ) transfected with EGFP-CL1 were maintained at  $37^{\circ}\text{C}$ , with slow continuous mixing in a Thermomixer compact (Eppendorf), for 5 or 6 h in 1 ml of DMEM containing either 2  $\mu$ M epoxomicin or 40  $\mu$ M AAF-cmk. After washing twice with PBS half the cells were pelleted and frozen in dry ice for analysis by Western blot. The remaining cells were analyzed for EGFP fluorescence by flow cytometry in a FACScalibur instrument (BD Biosciences). Data was analyzed with the FlowJo 7.2.2 software (Tree Star, Inc.).

### 2.5. Confocal microscopy

Cells for microscopy were grown on acid-treated coverslips, except for non-adherent Daudi cells which were transferred to poly-L-Lys coated coverslips after treatment with inhibitors. Fixation, permeabilization and labeling were performed as described [27]. Stained coverslips were mounted on slides with Mowiol 4-88 (Calbiochem) containing 2.5% 1,4-diazabicyclo(2.2.2)octane (DABCO). Images were acquired in a Zeiss Laser-Scanning Confocal Microscope (LSM510 META) mounted on a Zeiss Axiovert 200 motorized inverted microscope using a  $63\times/1.4$  oil Plan-Apochromat objective (Zeiss). At the time of image capture, all the parameters were set so that most pixels were within the dynamic range. Every confocal section was

acquired adjusting the pinhole size to at least 1 Airy unit, getting the best optical resolution for every wavelength. Merged images were prepared with the ImageJ software (NIH) [38]. Montages of images were assembled with Adobe Photoshop 7.0.1. and labeled with Adobe Illustrator 10 (Adobe Systems Inc.) In some instances images' levels were corrected using the ImageJ software to enhance the image quality, always maintaining linearity.

## 2.6. Time-lapse experiments

For time-lapse experiments EGFP-Ub transfectants of 143B-TK<sup>-</sup> osteosarcoma cells were plated in 35 mm glass bottom dishes (MatTek Corporation) and grown for 2 days in DMEM without phenol red. Cells were analyzed at 37 °C, with CO<sub>2</sub> and humidity controlled, in a Zeiss Axiovert 200 motorized inverted microscope using a 63×/1.4 oil Plan-Apochromat objective and equipped with an Electron Multiplier charge-coupled device camera (Hamamatsu, C9100-02). Images of phase contrast and EGFP fluorescence were acquired every 5 min, starting acquisition 15 min after the addition of the inhibitor; this interval has been corrected in the labels of Fig. 2 but not in the Supplemental Movies. Videos were prepared from the individual images using Metamorph 6.2r6 software (Universal Imaging).

## 2.7. Western blotting

Unless otherwise stated, cells were lysed with boiling SDS/PAGE sample buffer containing Complete Protease Inhibitors without EDTA (Roche). When cells were fractionated in soluble and insoluble fractions, cell pellets were lysed for 15 min on ice in a buffer containing 50 mM Tris/HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA and 2% Triton X-100. The lysates were then fractionated by centrifugation at 16,000×g for 15 min. In the case of staining with anti-Ub, 12% acrylamide SDS-PAGE gels were used, and proteins transferred overnight to nitrocellulose membranes (Hybond-ECL membranes, GE Healthcare) in a tank system; immediately after transfer the membranes were boiled in deionized water for 30 min to enhance its detection [39]. For GRK2 10% SDS-PAGE gels and Hybond-ECL membranes were used. For EGFP-CL1, SDS-PAGE was performed in 10% gels and transferred to PVDF membranes in a semidry system. In all instances membranes were developed by chemiluminescence (ECL, GE Healthcare).

## 2.8. siRNA silencing

The sequences of the synthetic siRNA duplexes targeting human TPPII have been reported [16]; as a negative control, Alexa Fluor 647-labeled siRNA (Qiagen) was used. The day before transfection with the siRNA, 1–1.5 × 10<sup>5</sup> 143B-TK<sup>-</sup> cells were added to each well of a 6-well plate. Transfections were carried out with 2 µg of the duplex using RNAiFect (Qiagen). In some experiments the cells transfected with the TPPII-specific siRNA were cotransfected with one tenth (0.2 µg) of Alexa Fluor 647-labeled control siRNA, in order to enable tracing the transfected cells by microscopy. Experiments were carried out 72 h after transfection. The results from the three sets of samples (no siRNA, control and TPPII siRNA) were statistically analyzed using the ANOVA (analysis of variance) test.

## 2.9. Enzymatic assays with fluorogenic substrates

TPPII activity in cell lysates was evaluated using the fluorogenic substrate AAF-amc. Experiments were carried out by two different methods that yielded similar results, using two fluorimeters: a CaryEclipse (Varian) which allows for continuous monitoring at 37 °C, and an Aminco-Bowman series 2 luminescence spectrometer. In the case of continuous monitoring of substrate hydrolysis we proceeded as previously described [16]. Alternatively, 4.2 × 10<sup>5</sup> cells

were lysed in 1 ml of lysis buffer; AAF-amc was added to a final concentration of 100 µM, and the mixture incubated at 37 °C. Aliquots corresponding to 7 × 10<sup>4</sup> cells were taken at different times, and reactions were stopped by adding trifluoroacetic acid in water to a final 0.3% (v/v). For the analysis of the chymotryptic activity of purified 20S proteasomes, reactions were carried out at 37 °C in 96-well plates using zGGL-amc as a substrate. Each well contained 100 ng of proteasome and 100 µM of substrate in 100 µl of 50 mM Tris/HCl, pH 7.5 and 5 mM MgCl<sub>2</sub>. Reactions were stopped by adding 100 µl of 3.6% SDS in water and measured in the CaryEclipse fluorimeter. When the activities of the two proteases were compared between different cell lines, the assays were performed with the different lysates normalized to contain ~300 µg of protein, and under similar conditions to those described for TPPII using the Aminco-Bowman spectrometer.

## 3. Results

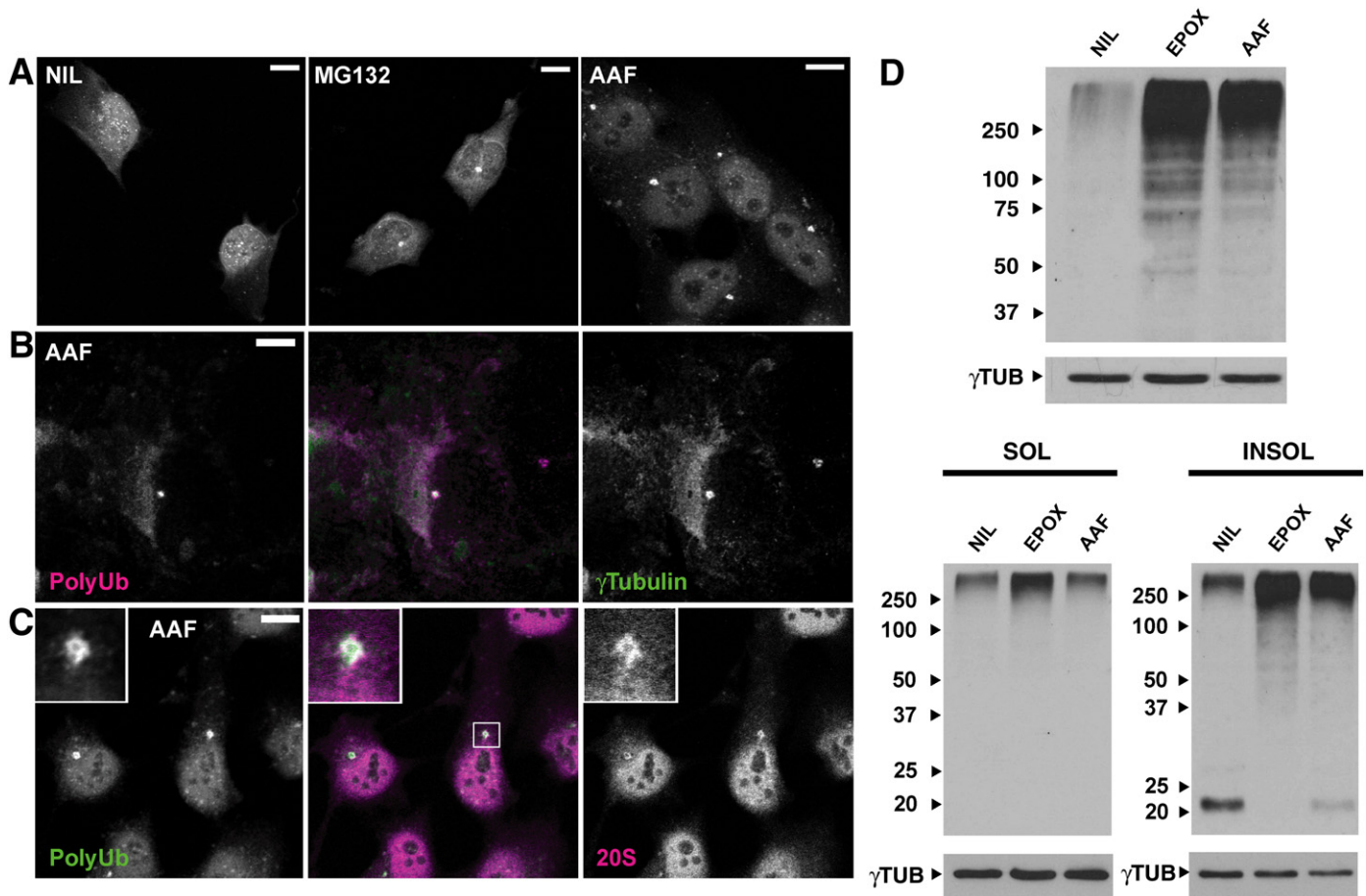
### 3.1. AAF-cmk induces perinuclear ubiquitin-containing accumulations that resemble aggresomes

First we analyzed by immunofluorescence the distribution of ubiquitylated proteins in cells treated either with AAF-cmk or with proteasome inhibitors using the FK2 monoclonal antibody, which stains mono- and polyubiquitylated substrates, but not free Ub. As shown in Fig. 1A for the osteosarcoma cell line 143B-TK<sup>-</sup>, and in agreement with previous reports, poly- and mono-Ub staining was predominantly nuclear in untreated cells. This pattern changed to mostly cytoplasmic staining in cells treated for 4 h with proteasome inhibitors (either MG132 or epoxomicin, Fig. 1A and see below). These cells showed also the formation of a perinuclear accumulation of ubiquitylated proteins. Of relevance, the intensity of staining also increased (not shown in the figure), which correlates with the expected accumulation of UPS substrates after proteasome inhibition. When cells were treated with 20 µM AAF-cmk, as shown in Fig. 1A, we could also observe a perinuclear accumulation of ubiquitylated proteins. However this treatment did not result in the increase of either global immunofluorescence intensity of polyUb staining or in the cytoplasmic over nuclear shift observed with proteasome inhibitors. We extended these experiments with AAF-cmk to a panel of cell lines, including: MG-63 (human osteosarcoma), HeLa (human cervical adenocarcinoma), NRK (rat kidney), MC57G (mouse fibrosarcoma), CV1 (African green monkey kidney), and Daudi (human Burkitt's lymphoma). Only MG-63, also an osteosarcoma, and Daudi cells formed perinuclear accumulations in response to AAF-cmk (Supplemental Fig. S1, Supplemental material, and results not shown).

These perinuclear accumulations resemble the aggresomes observed in cells overexpressing misfolded proteins or in cells after prolonged treatments with proteasome inhibitors [31,40]. As these aggregates are concentrated around the centrosome [26–28], we performed colocalization studies using γ-tubulin as a centrosomal marker. The results shown in Fig. 1B confirm that these accumulations, like bona fide aggresomes, are concentrated around the centrosome. Formation of these Ub<sup>+</sup> accumulations depended as well on microtubules, as they were absent in the presence of the tubulin-depolymerizing drug nocodazole (Supplemental Fig. S2A, Supplemental material).

Another feature of aggresomes is the incorporation of chaperones and members of the proteolytic machinery. We therefore analyzed by immunofluorescence whether the aggresomes induced by AAF-cmk recruited 20S proteasomes. As shown in Fig. 1C, there is a strong presence of 20S proteasomes in the Ub<sup>+</sup> irregularly shaped accumulations (see the inset in this figure), as has been shown to occur in aggresomes. We also detected recruitment of Hsp90 to the AAF-cmk induced aggresomes (Supplemental Fig. S2B, Supplemental material).





**Fig. 1.** Cellular distribution of ubiquitylated proteins in 143B-TK<sup>-</sup> cells, as detected by confocal microscopy using either FK1 or FK2 monoclonal antibodies. (A) Accumulation of polyubiquitylated substrates, detected with FK2, after protease inhibition. Cells were treated without inhibitor (NIL), with 20  $\mu$ M MG132 or 20  $\mu$ M AAF-cmk (AAF) during 4 h before fixation. Images correspond to maximum Z projections of optical sections. (B) Colocalization of Ub<sup>+</sup> accumulations stained with FK1 (left panel) and with  $\gamma$ -tubulin as a centrosomal marker (right panel). Both images are merged in the central panel. Images correspond to an optical section of 143B-TK<sup>-</sup> cells treated for 4 h with 20  $\mu$ M AAF-cmk before fixation with methanol/acetone. (C) AAF-cmk-induced Ub<sup>+</sup> accumulations detected with FK2 (left panel) recruit 20S proteasomes (right panel), as shown in the merged image (central panel). The insets show a detailed view of the squared accumulation in the merge panel. Bars = 10  $\mu$ m. (D) Analysis by WB with anti-Ub antiserum of cell lysates from 143B-TK<sup>-</sup> cells treated for 4 h in the absence (NIL) of inhibitors or in the presence of either 2  $\mu$ M epoxomicin (EPOX) or 50  $\mu$ M AAF-cmk (AAF). The top panel shows the result from whole lysates prepared in boiling SDS-PAGE sample buffer. The lower panels correspond to samples from the same experiment, where cells were fractionated in supernatant (SOL) and pellet (INSOL) as indicated in Materials and methods. The reaction with anti- $\gamma$ -tubulin as a loading control is also shown. A representative experiment is shown, out of three performed.

Therefore, these Ub<sup>+</sup> accumulations will be referred to hereafter as aggresomes.

We next tested whether AAF-cmk induced accumulation of ubiquitylated substrates by WB with anti-ubiquitin. As shown in the left panel in Fig. 1D AAF-cmk, like epoxomicin, induced the accumulation of ubiquitylated proteins. Interestingly, while in the case of epoxomicin ubiquitylated substrates accumulated both in the soluble and insoluble fractions, for AAF-cmk accumulation was evident only in the insoluble fraction.

### 3.2. Faster kinetics of aggresome formation for AAF-cmk than for epoxomicin

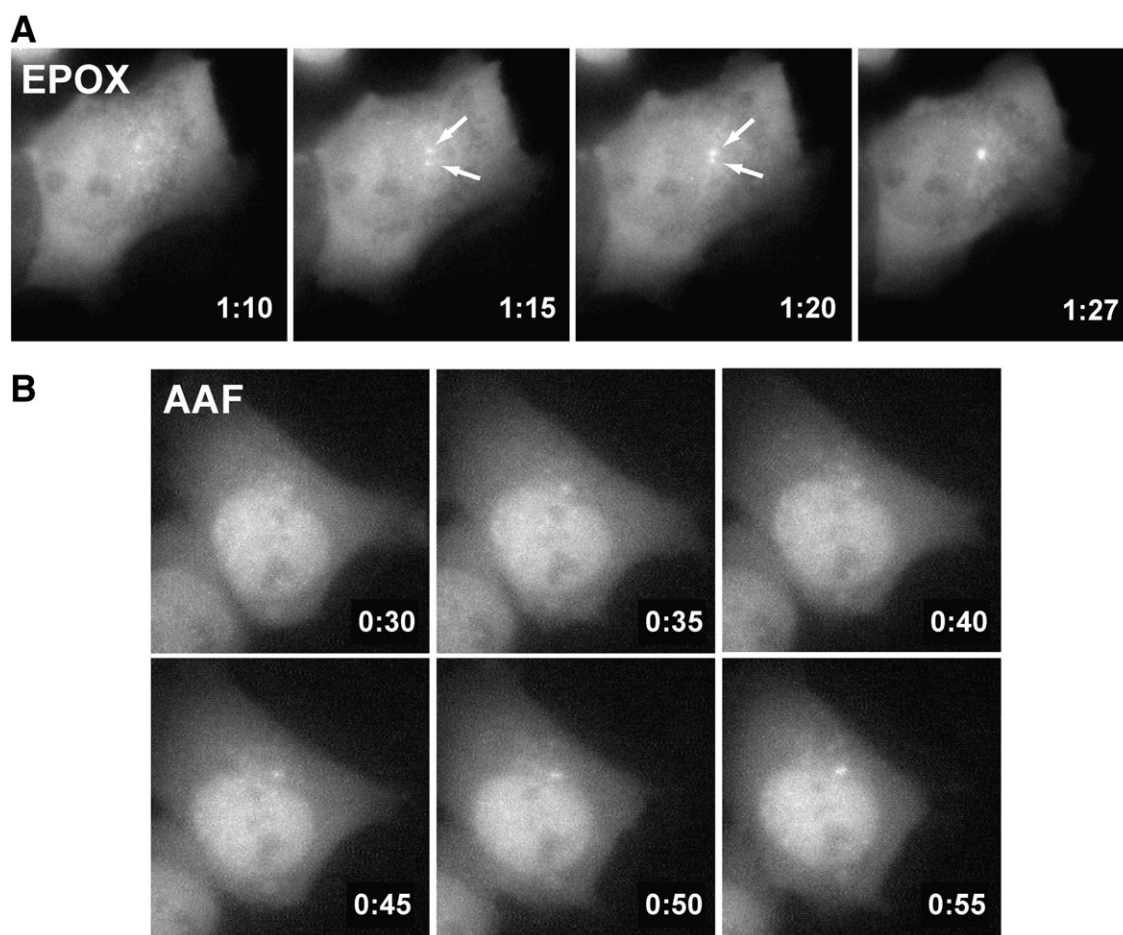
Preliminary experiments suggested that aggresome formation after treatment with AAF-cmk was faster than with proteasome inhibitors. In order to analyze this issue, we transfected 143B-TK<sup>-</sup> cells with a plasmid driving the expression of the fusion protein EGFP-ubiquitin (EGFP-Ub), which has been shown to have a behavior similar to that of unmodified Ub [36,41]. A clone obtained from stable transfectants was used for time-lapse experiments in the presence of either epoxomicin or AAF-cmk. As shown in Fig. 2A and Supplemental Movie 1, perinuclear accumulations start to appear after 1 h and 30 min of treatment with the proteasome inhibitor epoxomicin. In the cell shown it can be observed how two small EGFP-Ub<sup>+</sup> accumula-

tions fuse in one aggresome (arrows, Fig. 2A). The kinetics of aggresome formation in cells treated with AAF-cmk was faster, with accumulations being evident as early as 45 min, and probably earlier (Fig. 2B and Supplemental Movie 2). It is also relevant that the cellular distribution of EGFP-Ub<sup>+</sup> paralleled that of the polyUb staining shown in Fig. 1 after treatment with these inhibitors (see Supplemental Movies 1 and 2), supporting the validity of EGFP-Ub as a model for Ub. Cells imaged and treated with proteasome inhibitors started to show significant vacuolization after 2 h of treatment, something that was not observed in cells treated with AAF-cmk.

### 3.3. AAF-cmk does not affect proteasome catalytic activity

The faster kinetics observed with AAF-cmk than with epoxomicin argued against a possible secondary inhibition of the proteasome by the TPPII inhibitor. Although it has been reported earlier that AAF-cmk does not significantly affect the proteasome [14,42], we evaluated its effect both with purified 20S proteasomes and in live cells expressing a well characterized UPS substrate (EGFP-CL1). With purified 20S proteasomes we analyzed the chymotryptic-like activity using a fluorogenic substrate; this is the activity that has the highest probability of being targeted by the hydrophobic AAF-cmk. However, as shown in Table 1, we observed no significant effect of this inhibitor





**Fig. 2.** Time-lapse experiments of 143B-TK<sup>-</sup> cells transfected with EGFP-Ub and treated with 2  $\mu$ M epoxomicin (A) or 40  $\mu$ M AAF-cmk (B). The figure shows the time points (in hours: minutes) where aggresomes become evident, and correspond to Z projections of three sections. Arrows in (A) indicate two individual accumulations that eventually fuse into a single aggresome. Both (A) and (B) correspond to selected regions of the whole frame, which is shown in the Supplemental Movies 1 and 2, Supplemental material. This experiment has been performed three different times, always showing faster kinetics for AAF-cmk than for epoxomicin.

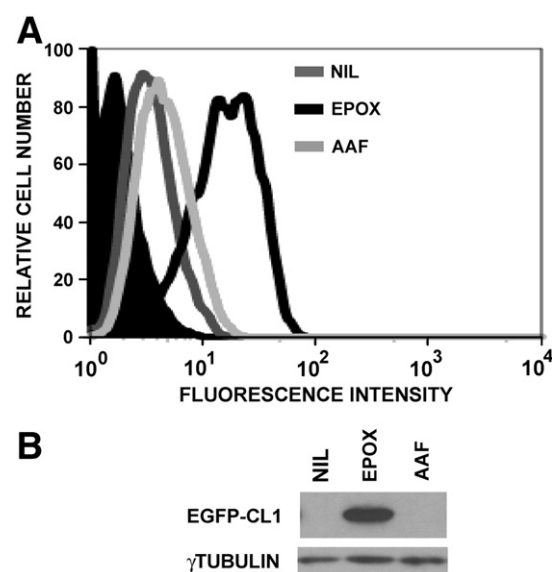
on this activity, whereas epoxomicin caused a 60% inhibition, and MG-132 blocked it completely (Table 1).

We evaluated next the effect of AAF-cmk on the stability of EGFP-CL1 in live cells. 143B-TK<sup>-</sup> cells expressing EGFP-CL1 were treated for 5 h with epoxomicin, AAF-cmk or left untreated and analyzed by flow cytometry; the result of a typical experiment is shown in Fig. 3A (this experiment has been repeated several times with identical results). Some of these cells were lysed in SDS-PAGE sample buffer and analyzed by Western blot (WB) developed with anti-GFP, as shown in Fig. 3B. While epoxomicin stabilized EGFP-CL1, AAF-cmk did not alter significantly the fluorescence of the cells. The slight shift in fluorescence of AAF-cmk-treated cells in Fig. 3A is similar to that observed in the autofluorescence of untransfected cells treated with this inhibitor (data not shown), and is probably not significant. By WB EGFP-CL1 was detected only in extracts from epoxomicin-treated cells, and could not be detected in the control cells or after treatment

**Table 1**  
Effect of different protease inhibitors on the chymotryptic-like activity of purified 20S proteasomes.

Inhibitor	% of activity of control <sup>a</sup>
2 $\mu$ M epoxomicin	39.4 $\pm$ 7.3
20 $\mu$ M MG132	–2.7 $\pm$ 4.6
40 $\mu$ M AAF-cmk	92.7 $\pm$ 8.2

<sup>a</sup> Remaining proteasome activity after treatment with the indicated inhibitors. Results are expressed as mean remaining activity  $\pm$  standard deviation ( $n$  is 5 for epoxomicin, 3 for MG132 and 4 for AAF-cmk).



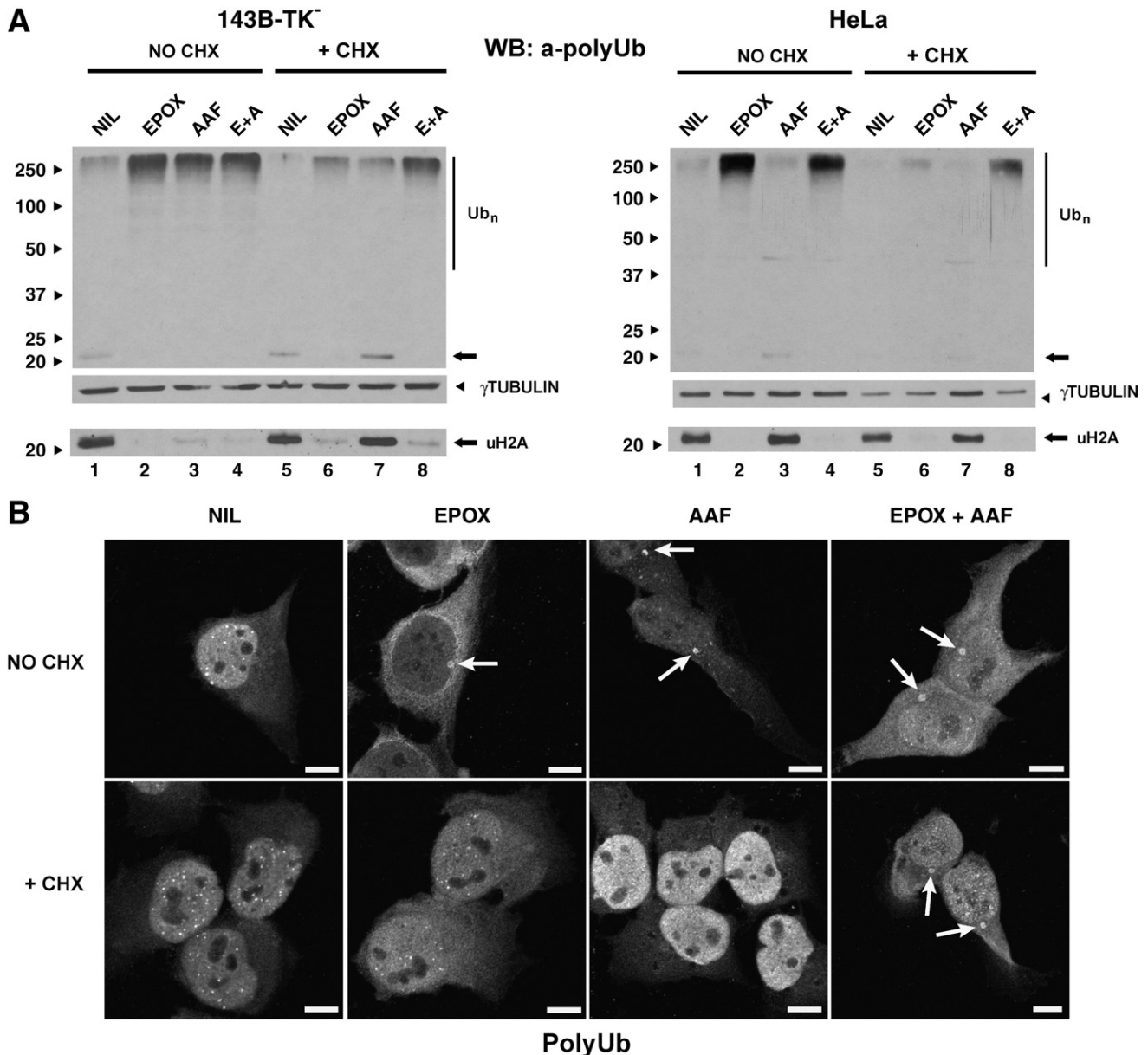
**Fig. 3.** Analysis of the accumulation of the UPS substrate EGFP-CL1 after treatment with inhibitors. Stable EGFP-CL1 transfectants of 143B-TK<sup>-</sup> cells were incubated for 5 h without inhibitor (NIL), with 2  $\mu$ M epoxomicin (EPOX) or 40  $\mu$ M AAF-cmk (AAF). Cells were analyzed by (A) flow cytometry and (B) WB. The filled histogram in (A) corresponds to untransfected cells. The reaction with anti- $\gamma$ -tubulin as a loading control is also shown in (B). The experiment has been performed with two different clones and repeated several times with similar results.

with AAF-cmk (Fig. 3B). Therefore, by these criteria, AAF-cmk does not affect significantly proteasome activity either with purified proteasomes or in live cells.

#### 3.4. Formation of AAF-cmk-induced accumulation of polyubiquitylated proteins depends on protein synthesis, but not when added together with proteasome inhibitors

It has been shown that the accumulation of ubiquitylated substrates by proteasome inhibitors depends on protein synthesis, in line with the DRiPs hypothesis. We therefore performed experiments to evaluate whether the formation of AAF-cmk induced accumulations similarly depended on protein synthesis. As shown in Fig. 4A, and in agreement with the results shown in Fig. 1A, in 143B-TK<sup>-</sup> (left panel) both epoxomicin and AAF-cmk induced the

accumulation of ubiquitylated substrates. This accumulation was prevented almost completely in both instances by the addition of the protein synthesis inhibitor cycloheximide (CHX). However, when both AAF-cmk and epoxomicin were added simultaneously, CHX did not prevent the accumulation. This could also be observed by immunofluorescence: in the presence of CHX only the cells incubated simultaneously with AAF-cmk and epoxomicin presented aggresomes, whereas those treated individually with either AAF-cmk or epoxomicin did not (Fig. 4B). This was confirmed in six different experiments with an average of 80% of the cells presenting aggresomes, out of a total of 269 cells counted. Another significant observation that can be derived from the WB in Fig. 4A deals with the band which, according to its size and response to proteasome inhibition (Fig. 4A, left panel), its presence in the nuclear fraction in subcellular fractionation experiments (see the lower panels in Fig. 1D)



**Fig. 4.** Effect of inhibition of protein synthesis on the formation of Ub<sup>+</sup> accumulations. A representative result out of at least four different experiments is shown in each case. (A) WB, developed with anti-Ub, of lysates from 143B-TK<sup>-</sup> (left panel) or HeLa (right panel) cells treated for 4 h without inhibitor (NIL), 2 μM epoxomicin (EPOX), 60 μM AAF-cmk (AAF) or a mixture of both (E + A), in the presence or in the absence of 25 μM cycloheximide (CHX). The arrows show the bands probably corresponding to uH2A. Higher exposure of these areas of the gels is shown at the bottom. The reaction with anti-γ-tubulin as a loading control is also shown. (B) Analysis by confocal microscopy of 143B-TK<sup>-</sup> cells treated as in (A) and stained with the polyUb-specific FK2 antibody. In this experiment AAF-cmk and cycloheximide were used at 70 μM and 200 μM, respectively. In the presence of cycloheximide, aggresomes were only visible when both epoxomicin and AAF-cmk were present. Images correspond to maximum Z projections of optical sections. Arrows mark the position of aggresomes. Bars = 10 μm.

and its reactivity with anti-histoneH2A antibodies (Supplementary material Fig. 3A), most likely correspond to mono-ubiquitylated histone 2A (uH2A) [43]; we will use this term throughout the text when referring to this band. As expected, epoxomicin treatment depleted uH2A, which correlates with decreased levels of free Ub, known to be reduced after proteasome inhibition [43]. AAF-cmk had a similar effect on uH2A, although to a lesser extent than epoxomicin (in other experiments not shown, a stronger signal for uH2A in AAF-cmk-treated cells was obtained). Interestingly, although CHX considerably reduced the epoxomicin-induced accumulation of high Mr ubiquitylated substrates, it only partially restored the levels of uH2A detected in the WB (compare lanes 2 and 6 with lanes 1 and 5 in Fig. 4A, left panel). In the case of AAF-cmk, however, uH2A levels in the presence of CHX were comparable to those in the control cells (compare lanes 3 and 7 with 1 and 5 in Fig. 4A, left panel). The results were identical when we used 143B-TK<sup>-</sup> cells transfected with EGFP-Ub and the WB was developed with anti-GFP (Supplementary material Fig. 3B). It is also evident from Fig. 4B that, in the presence of CHX, epoxomicin did not induce the change in polyUb staining from mainly nuclear to cytoplasmic, fully in agreement with the WB data. This is probably related to the drastic reduction in substrate amount in the absence of protein synthesis.

We next repeated this analysis by WB with HeLa cells, one of the cell lines that did not form aggresomes in response to AAF-cmk. As expected, no accumulation of ubiquitylated substrates could be detected by WB in cells treated with AAF-cmk, with no reduction in the uH2A band (Fig. 4A, right panel; compare lanes 3 and 1). Epoxomicin induced both the accumulation of polyubiquitylated proteins and an almost complete disappearance of uH2A (compare lanes 2 and 1 in Fig. 4A, right panel). As expected, addition of cycloheximide prevented the accumulation of polyubiquitylated substrates induced by the proteasome inhibitor (see lane 6 in Fig. 4A, right panel). However, as was the case with the 143B-TK<sup>-</sup>, adding AAF-cmk and epoxomicin together resulted in accumulations even in the absence of protein synthesis (lane 8 in Fig. 4A, right panel). Thus, although the two cell lines differ with respect to their response to AAF-cmk alone, both show a similar behavior when the inhibitor is added together with epoxomicin. This kind of study was also performed with two other cell lines, one sensitive (MG-63) and one resistant (CV1) to AAF-cmk-induced aggresome formation, and identical results to 143B-TK<sup>-</sup> and HeLa cells, respectively, were obtained (Supplementary material Fig. 3C).

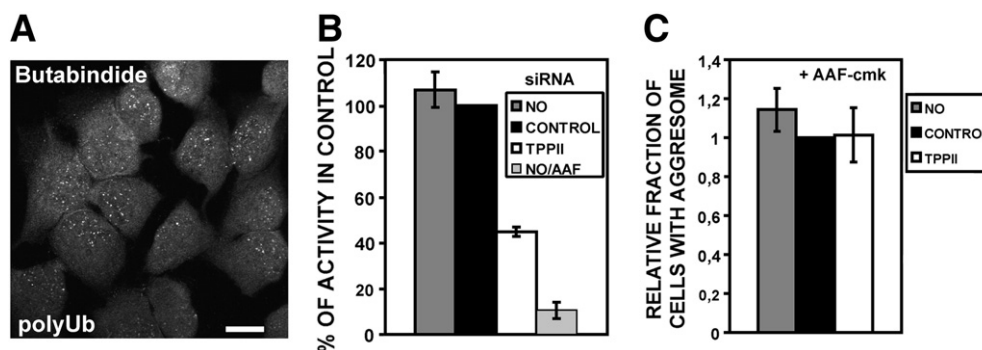
### 3.5. Neither butabindide nor gene silencing of TPPII induces aggresomes

AAF-cmk is a serine protease inhibitor, known to inhibit various proteases *in vitro* [44], and expected not to be exclusively specific for

TPPII in live cells. Therefore, in order to ascertain whether TPPII inhibition is responsible or not for aggresome formation in our system, we performed two additional sets of experiments. First, we used butabindide, a more specific inhibitor of TPPII that is chemically unrelated to AAF-cmk. Butabindide is a substrate analog that reversibly inhibits TPPII [45] and that has been shown to do so in live cells when serum is absent from the culture medium [19]. When 143B-TK<sup>-</sup> cells were treated with butabindide at 200  $\mu$ M, no aggresomes and no major changes in polyUb distribution were observed (Fig. 5A; compare with Figs. 1A and 4); we also tested concentrations of butabindide up to 500  $\mu$ M with similar results (data not shown). We analyzed whether the inhibitor was blocking TPPII activity in our system (see Supplementary Fig. S4A, Supplementary material, for representative experiments). In cell lysates, butabindide inhibited the hydrolysis of the TPPII fluorogenic substrate AAF-amc to a similar extent as AAF-cmk (86–94% and 90–95% inhibition in different experiments, respectively); second, even though butabindide is a reversible inhibitor, when lysates were prepared from cells treated in culture with the inhibitor, butabindide inhibited AAF-amc hydrolysis even more strongly (70–75%) than AAF-cmk (45–58%). The somehow low inhibitory potential of AAF-cmk in live cells may be explained in part by its potential susceptibility to aminopeptidases in live cells, which may compromise its effect on TPPII. These results confirm that butabindide affected TPPII in our culture conditions, at least to a similar extent as AAF-cmk, and yet did not induce aggresomes.

In a second approach, we used siRNA-mediated silencing of TPPII expression. In these experiments, 143B-TK<sup>-</sup> cells were transfected with a siRNA targeting TPPII, with a control siRNA, or not transfected. On day three after transfection, part of the cells were lysed and their AAF-amc-hydrolyzing activity was analyzed. The results are shown in Fig. 5B, and indicate that the interference with TPPII expression was very consistent between different experiments (55.2%  $\pm$  1.2 average inhibition  $\pm$  standard deviation). This is probably an underestimation of the interference with expression, given that the lysates of fibroblasts and splenocytes from mice genetically deficient in TPPII retain some 20% AAF-amc hydrolyzing activity [46]. As a control, full inhibition was achieved when AAF-cmk was added to the lysates. The remaining cells, which had been grown on coverslips, were further incubated under different conditions, fixed, permeabilized and stained with the anti-polyUb antibody FK2. In the absence of AAF-cmk, siRNA interference with TPPII expression did not induce the formation of aggresomes (only 4% of the cells in the absence of the inhibitor had polyUb accumulations resembling aggresomes, both with and without the TPPII-specific siRNA), similarly to what happened with butabindide (Fig. 5A).

We next evaluated the effect of siRNA transfection on the sensitivity of the cells to AAF-cmk. If TPPII inhibition were responsible



**Fig. 5.** Lack of effect of the TPPII inhibitor butabindide and of TPPII-specific siRNA on aggresome formation. (A) Lack of aggresome induction in cells treated with 200  $\mu$ M butabindide for 4 h, changing the medium with fresh butabindide after 2 h, and stained with FK2. Bar = 20  $\mu$ m. (B) TPPII activity, measured by AAF-amc hydrolysis, in cell lysates of untransfected cells (NO), and cells transfected with either a control or a TPPII-specific siRNA. As a control, lysates from untransfected cells were incubated with the substrate in the presence of AAF-cmk (NO + AAF). The graph is the mean of 4 different experiments and data are normalized to the cells transfected with the control siRNA; error bars correspond to the standard deviation. (C) Relative aggresome content of cells treated with AAF-cmk under conditions that resulted in only a fraction of 40–60% of the cells showing aggresomes. The results are relative to the aggresome content of cells transfected with the control siRNA, defined as 1. The graph is the result of 4 different experiments, with total number of cells counted being 439, 472 and 583 for the NO, CONTROL and TPPII, respectively.



for the formation of aggresomes in AAF-cmk treated 143B-TK<sup>-</sup> cells, we would expect the cells transfected with the specific siRNA to have an increased sensitivity to suboptimal doses of the inhibitor. In order to have a quantitative estimate of this effect, we performed a series of experiments in which we treated the cells with increasing concentrations of AAF-cmk (20, 40 and 80  $\mu$ M) for either 2 or 4 h or left them untreated. In each experiment we chose the conditions of AAF-cmk treatment that were suboptimal for aggresome formation, i.e., that resulted in around only half of the cells having aggresomes. By doing so, a potential additive effect of the siRNA on aggresome formation by AAF-cmk should be optimally detected. As shown in Fig. 5C, the reduced TPPII activity in cells transfected with the peptidase specific siRNA had no additional effect on the ability of the cells to form aggresomes in response to AAF-cmk. This was confirmed by performing repeated analysis with the ANOVA test, confirming that there was no significant difference between the three samples. This was also true in the experiments in which the Alexa Fluor 647-labeled control siRNA was cotransfected with the TPPII siRNA, allowing us to identify the cells that had been clearly transfected; in these cases, the fraction of aggresome-containing cells was identical whether the cells had incorporated the dye or not (data not shown). As controls, when cells transfected with the TPPII siRNA were treated with either epoxomicin or butabindide, instead of AAF-cmk, we did not observe any changes in the effect of these inhibitors with respect to either untransfected cells or cells transfected with the control siRNA (not shown).

The siRNA experiments together with the results obtained with butabindide constitute strong evidence against the contribution of TPPII inhibition to the accumulation of polyubiquitylated substrates in response to AAF-cmk. As discussed earlier, Burkitt's lymphoma cells have been reported to have a decreased proteasome activity and an increased TPPII activity, in comparison with other lymphoblastoid cell lines [12], and this was correlated with an increased sensitivity to AAF-cmk. However, our results would predict that accumulation of polyUb by treatment with AAF-cmk and elevated TPPII cellular content are separate events. In this context, we compared the TPPII and proteasome chymotryptic activities in three of the cell lines used in the study: the AAF-cmk sensitive Daudi and 143B-TK<sup>-</sup> and the resistant HeLa cell lines. As shown in Supplemental Fig. S4B, Supplemental material, there was indeed no correlation. When proteasome activity relative to TPPII activity was evaluated, we found that 143B-TK<sup>-</sup> and HeLa cell lines had similar proteasome activity, whereas this was higher in Daudi cells. Therefore, the sensitivity of the different cell lines to AAF-cmk does not correlate with an increased TPPII activity compared to proteasome activity.

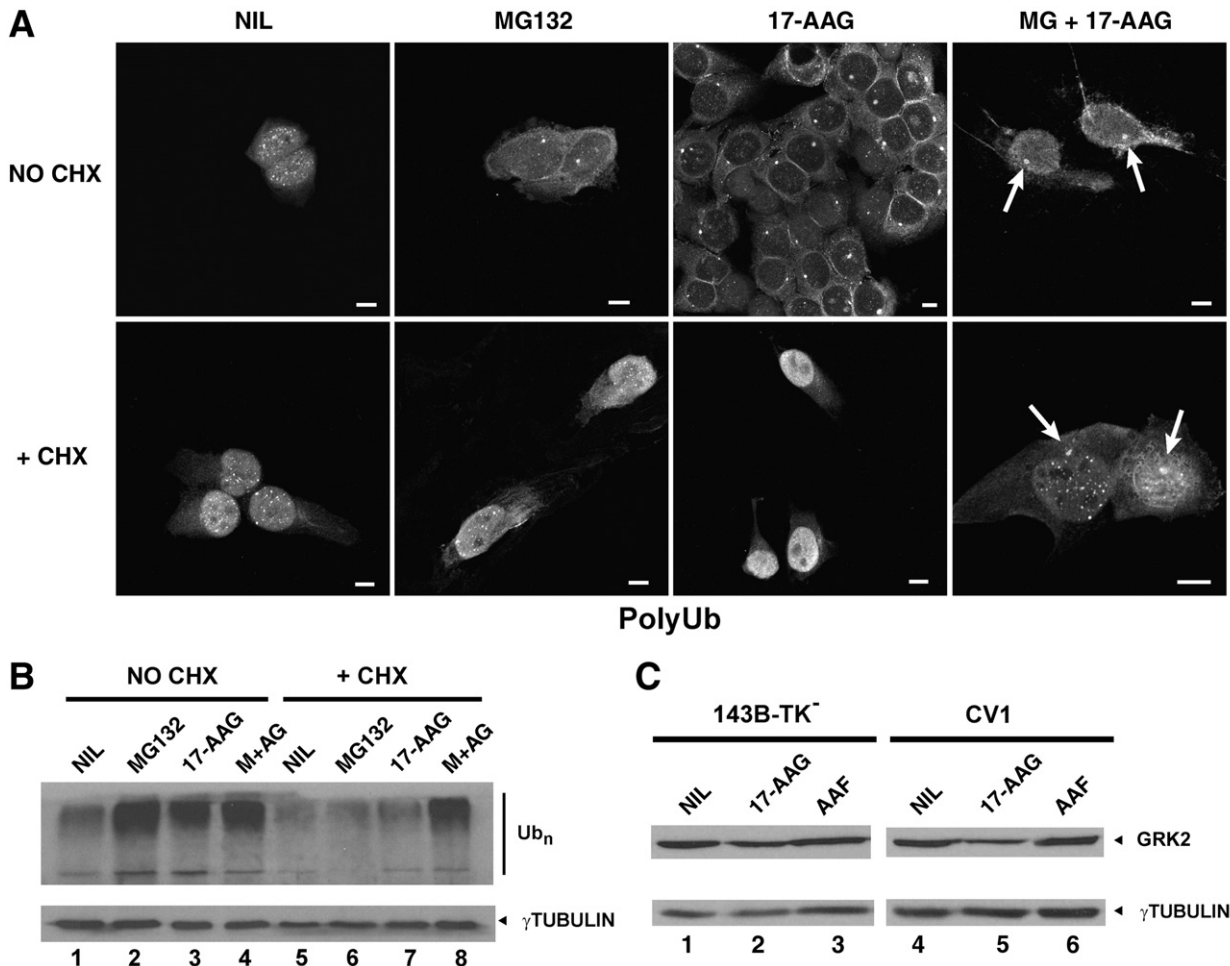
### 3.6. Hsp90 inhibition and AAF-cmk have similar, but not identical, effects on aggresome formation

Based on the results obtained that discarded TPPII as a relevant AAF-cmk target for aggresome formation and those dissecting the sensitivity to protein synthesis inhibitors, we hypothesized that potential target candidates for AAF-cmk could lie in regulatory circuits upstream the proteasome catalytic activity (see Discussion). According to our working hypothesis, AAF-cmk may act by inducing the degradation of substrates that are stable in the absence of the inhibitor. In proteasome-compromised cells, such as those adapted to proteasome inhibitors or Burkitt's lymphoma cells, this may saturate the UPS and result in the accumulation of at least a fraction of those substrates. This is what may be happening in the osteosarcoma cell line 143B-TK<sup>-</sup>. The chaperone Hsp90, an essential protein involved in cellular homeostasis, signal transduction and protein folding [47], is at the heart of one of these regulatory circuits. Inhibition of Hsp90 leads to the degradation of some of its clients, many of them protein kinases, a process at least in part mediated by the UPS [48,49]. This makes Hsp90 a potential candidate as an AAF-cmk target. Therefore

we wondered if inhibition of Hsp90 could result in an accumulation of ubiquitylated targets similar to that observed with AAF-cmk. We addressed this possibility by performing experiments similar to those shown in Fig. 4, now using the Hsp90 inhibitor 17-(Allylamino)-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG), an analog of the ansamycin antibiotic geldanamycin [50], which has been shown to induce aggresome formation in MCF10A cells overexpressing synphilin 1, a protein implicated in Parkinson's disease [51]. The results showed that, similar to AAF-cmk, 17-AAG induced the formation of aggresomes in 143B-TK<sup>-</sup> cells (Fig. 6A; this was observed in 75% of the cells in seven different experiments where 260 cells were counted). The cytosol to nuclear distribution of ubiquitylated substrates was, however, more similar to that obtained with proteasome inhibitors than with AAF-cmk. An important finding in this experiment is that 17-AAG and AAF-cmk shared the pattern of sensitivity to cycloheximide: the accumulations formed even in the absence of protein synthesis when either inhibitor was added simultaneously with proteasome inhibitors, as seen in 69% of the cells in three different experiments, where 286 cells were counted. These results were confirmed by WB with anti-Ub (Fig. 6B), which also showed the accumulation of polyubiquitylated proteins in the absence of protein synthesis only when 17-AAG and MG132 were added simultaneously (compare lane 8 with lanes 6 and 7 in Fig. 6B). In summary, both AAF-cmk and 17-AAG induced aggresome formation in 143B-TK<sup>-</sup> cells, and both inhibitors displayed similar sensitivity to CHX. However, the cellular distribution of ubiquitylated substrates was different for these inhibitors. This left open the question of whether Hsp90 is a target for AAF-cmk, and therefore the next experiments were designed to address this issue. G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) is a well known Hsp90 client that is degraded by the proteasome upon treatment with geldanamycin [52]. We thus analyzed by WB the effect of a 15-hour incubation with either 50  $\mu$ M AAF-cmk or 1  $\mu$ M 17-AAG on the steady state levels of GRK2, both in 143B-TK<sup>-</sup> cells and in the AAF-cmk-insensitive cell line CV1 (Fig. 6C). The results show that 17-AAG induced a significant reduction in the levels of GRK2 in CV1 cells (compare lanes 5 and 4) and a marginal but consistent reduction in 143B-TK<sup>-</sup> cells (compare lanes 2 and 1). However, treatment with AAF-cmk did not change the levels of GRK2 in any of the cell lines (lanes 3 and 6). Therefore, although AAF-cmk and the Hsp90 inhibitor share the overall effect of accumulation of polyUb substrates (Fig. 6A and B), the relevant target(s) of AAF-cmk seems to be different from Hsp90, as it did not affect the stability of one of the clients of this chaperone.

## 4. Discussion

There is no general agreement regarding the existence of significant proteolytic routes in the cytosol alternative to the UPS [53]. One source of evidence in support of these pathways came from cells adapted to grow in the presence of proteasome inhibitors [13], which seemed to upregulate a proteolytic activity later identified as TPPII [14]. However, it has been suggested that cells adapted in this way still depend on active proteasomes for survival [20] and they maintain a significant proteasomal tryptic- and caspase-like activities [21]. Another example comes from Burkitt's lymphoma cells that, like those adapted to proteasome inhibitors, seem to have low proteasome activity and high TPPII levels and activity [12]. However, increased TPPII activity in initial reports of adapted cells may be coincidental rather than a consequence of low proteasomal activity. A recent report shows that Burkitt's lymphoma cells can be further adapted to grow in the presence of the proteasome inhibitor bortezomib and, intriguingly, these adapted cells have reduced levels of TPPII as compared to the parental, non-adapted cells [54]. Furthermore, for three other cell lines adapted to bortezomib neither the levels nor the activity of TPPII were altered [55]. Interestingly, a consistent adaptation of these cells was a reduction in the rate of protein synthesis. Another issue that has



**Fig. 6.** Effect of Hsp90 inhibitor 17-AAG and MG132 on polyUb cellular distribution and accumulation and on the steady state levels of GRK2. (A) 143B-TK<sup>-</sup> cells in coverslips were treated for 4 h without inhibitor (NIL), 10  $\mu$ M MG132, 1  $\mu$ M 17-AAG, or a mixture of both (MG + 17-AAG), in the presence or absence of 200  $\mu$ M cycloheximide (CHX), then fixed, permeabilized and stained with the FK2 antibody. Images correspond to maximum Z projections of optical sections. Arrows in the fourth column mark the position of aggregates. Bars = 10  $\mu$ m. (B) Analysis by WB with anti-Ub antibody of cell lysates obtained from 143B-TK<sup>-</sup> cells treated as in (A); M + AG indicates the treatment with both MG132 and 17-AAG, shown in lanes 4 and 8. (C) WB developed with anti-GRK2 of cell lysates from either 143B-TK<sup>-</sup> or CV1 cells treated for 14 h and 30 min without inhibitor (NIL), 4  $\mu$ M 17-AAG or 50  $\mu$ M AAF-cmk. In (B) and (C), the reaction with anti- $\gamma$ -tubulin as a loading control is also shown.

not been fully addressed is what other adaptations occur in these cells. It is known that, besides TPPII, they upregulate Ub-specific proteases [12,56] but little is known about other adjustments that may occur.

Other results have shown that adapted cells share some relevant characteristics with non-adapted cells transfected with a TPPII cDNA plasmid; some of these characteristics include an increased cell viability in response to proteasome inhibition or enhanced *in vivo* tumor cell survival [21,22]. This may be related to the effect that overexpression of TPPII seems to have on centrosomal duplication and genetic stability [57,58], or to how critical for the cell is to destroy potentially dangerous or toxic cytosolic small peptide fragments, which are natural TPPII substrates, as suggested by the pro-apoptotic effect that aminopeptidase inhibitors have on leukemic and myeloma cells [59,60]. The overexpressing cells also failed to accumulate ubiquitylated proteins in response to proteasome inhibition [21], but whether they did in response to AAF-cmk was not reported. TPPII has been suggested to have tripeptidyl aminopeptidase activity on substrates of preferentially 16 aminoacids or longer, being the main cellular activity responsible for trimming these intermediates [19,61]. This may explain the dependency on TPPII activity of the adapted cells, since these cells still require proteasome activity for survival [20], and proteasomes from cells treated with high concentrations of proteasome inhibitors can degrade protein substrates *in vitro*, although at a reduced level [62]. The products of the proteasomal

proteolysis may be longer in the adapted cells and therefore depend on TPPII activity to produce smaller peptides that could be further digested by oligopeptidases. There are two reports of mice deficient in TPPII, with conflicting results in terms of viability, none of them reporting alterations in cellular proteolysis. Whereas in one case the homozygous mice were embryonic lethal [63], in the other report mice were viable [64] and their MHC class I mediated immune responses were not altered. In agreement with the latter, a recent report of TPPII-deficient gene-trapped mice showed no alterations in the CD8<sup>+</sup> T cell antiviral immune response [65].

While trying to address the role of TPPII in cytosolic proteolysis in different cell lines, we found that in two osteosarcoma and one Burkitt's lymphoma cell lines AAF-cmk induced the accumulation of ubiquitylated proteins and changed their cellular distribution, giving rise to structures resembling aggregates. Given that we showed that the AAF-cmk induced accumulations are not produced by direct or secondary inhibition of cell proteasomes, the most likely candidate would be TPPII. However, the results we obtained with the more specific inhibitor of TPPII butabindide and by silencing TPPII expression seem to exclude the inhibition of this aminopeptidase as responsible for the AAF-cmk-induced accumulation of ubiquitylated proteins and aggregate formation.

Then, if it is not TPPII, what is the relevant target of AAF-cmk? This inhibitor induces the accumulation of ubiquitylated substrates but, for

the reasons detailed above, these substrates seem to be different from those accumulated by inhibition of the proteasome. Then we are faced with at least two possibilities: 1) two independent proteolytic pathways or 2) the same pathway, with the AAF-cmk target being either upstream or downstream the proteasome. The differential sensitivity to protein synthesis inhibition observed either with the individual inhibitors or with the mixture of both is crucial when trying to discriminate between these possibilities. Accumulation of ubiquitylated proteins induced by either AAF-cmk or epoxomicin alone was absent when protein synthesis was inhibited. However when the two inhibitors were added together the accumulations formed, and polyUb proteins accumulated as detected by WB, even in the absence of protein synthesis. In this context the results in HeLa cells are of critical relevance. This cell line fails to form aggresomes in response to AAF-cmk alone, but accumulates polyUb proteins when treated together with epoxomicin in the absence of protein synthesis. This seems incompatible with the first possibility, namely that we are dealing with two independent proteolytic pathways, because in the resistant cells the simultaneous addition of AAF-cmk and proteasome inhibitors gives a non-additive, new behavior not observed with any of the inhibitors separately. These results therefore seem more compatible with the second possibility, i.e. that AAF-cmk and epoxomicin are acting on the same pathway. When protein synthesis is inhibited AAF-cmk induces the accumulation of ubiquitylated substrates only when the proteasome is also inhibited, suggesting that the proteasome acts downstream given that their degradation still depends on its activity. Although we cannot rule out that AAF-cmk acts downstream the proteasome, affecting an activity further trimming proteasomal products, we think this is unlikely given the kinetic data obtained and the fact that these products should be susceptible to ubiquitylation and degradation by the proteasome. Therefore the protein or pathway targeted by AAF-cmk may be acting upstream the proteasome by, for example, either helping to maintain the correct protein folding or controlling the fate of potential UPS substrates. Examples of either of these pathways include chaperones, such as Hsp90 [66] and Hsp70 [67], cochaperones such as CHIP [68], or regulatory circuits of ubiquitylation and deubiquitylation of substrates, like those present in the 26S proteasome [69] and the p97/VCP complex [70]. All these examples constitute systems where regulated choices are taken on the fate of their clients/substrates: folding vs. unfolding, stabilization vs. UPS targeting, and deubiquitylation vs. ubiquitylation. AAF-cmk's effect would be to favor the second of these possibilities. We tested this hypothesis by evaluating one of the aforementioned candidates, Hsp90. Using the geldanamycin analog 17-AAG we showed that although Hsp90 is not a target of AAF-cmk, its inhibition leads to similar, although not identical, effects as those obtained with AAF-cmk. These results lend support to the mode of action suggested for AAF-cmk.

Our results are compatible with those showing that proteasome inhibitor-adapted cell lines still depend on proteasome activity for survival [20], and may explain, at least in part, their sensitivity to AAF-cmk, particularly concerning the accumulation of ubiquitylated substrates induced by this inhibitor. This could also be the case for Burkitt's lymphoma. The working model is that a pathway that controls the fate of potential UPS substrates is targeted by AAF-cmk in a way leading to the production of more substrates. A compromised handling of these substrates, by reduced proteasome activity, incorrect trafficking or inability to prevent aggregation of these new substrates, may result in their accumulation; this is what we have observed in the two osteosarcoma and the Burkitt's lymphoma cell lines. Whatever the cause, they would still depend on proteasome activity for the final degradation of these substrates. Therefore, our results would suggest that TPPII does not play the prominent role that has been suggested as an alternative to the proteasome, although a more restricted role cannot be ruled out. It should be mentioned, however, that our analysis did not include proteasome inhibitor-

adapted cell lines, and therefore it is possible that our model may not apply to them. However Burkitt's lymphoma cells were tested and the results were comparable to those with the osteosarcoma cell lines; these lymphoma cells share many characteristics with the adapted cells, attributed to similar adaptations.

Finally, only two osteosarcoma and one Burkitt's lymphoma cell lines formed aggresomes in response to AAF-cmk, while none of the other lines tested did. Therefore, finding the relevant target(s) of the inhibitor can be informative in terms of finding potential therapeutic targets for the treatment of osteosarcoma. Currently there are treatments that target some of the pathways mentioned above in different phases of clinical trials for different tumors, including the proteasome inhibitor bortezomib [71] and the Hsp90 inhibitor 17-AAG [72], the latter being in a phase I trial for osteosarcoma and neuroblastoma [73].

## Acknowledgements

We thank Jon Yewdell and Jack Bennink (National Institutes of Health, Bethesda, MD), Cristina Murga (Centro de Biología Molecular, CBMSO, Madrid), Silvia García (Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid) and Pedro Esbrit (Fundación Jiménez Díaz, Madrid) for reagents and cell lines. We wish to thank Jose A. López de Castro (CBMSO, Madrid) for continuous support, Miguel Marcilla (CBMSO, Madrid) for his help with proteasome purification and for suggestions, Iñaki Alvarez (Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona) and Jose Lucas (CBMSO, Madrid) for helpful comments and members of the Microscopy facility for their help. This work was supported in part by grant BMC-2002-00457 from the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia (to L. C. A.), from Instituto de Salud Carlos III (to M. D. V.), and by grants from the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia (SAF-2007-60934) and from Comunidad de Madrid (to M. D. V. and L. C. A.). The Centro de Biología Molecular Severo Ochoa is supported by an institutional grant from the Fundación Ramón Areces. E.M.V. was supported by a FPI fellowship from the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia and by CSIC, L.L.-F. by a FPI fellowship and S.G. by Instituto de Salud Carlos III.

## Appendix A. Supplemental data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.bbamcr.2010.06.001](https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.06.001).

## References

- [1] M. Groll, R. Huber, Substrate access and processing by the 20S proteasome core particle, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35 (2003) 606–616.
- [2] C.M. Pickart, R.E. Cohen, Proteasomes and their kin: proteases in the machine age, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5 (2004) 177–187.
- [3] A. Ciechanover, The ubiquitin–proteasome pathway: on protein death and cell life, *EMBO J.* 17 (1998) 7151–7160.
- [4] A. Varshavsky, Regulated protein degradation, *Trends Biochem. Sci.* 30 (2005) 283–286.
- [5] T. Saric, C.I. Graef, A.L. Goldberg, Pathway for degradation of peptides generated by proteasomes: a key role for thimet oligopeptidase and other metalloproteases, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 46723–46732.
- [6] J.W. Yewdell, E. Reits, J. Neefjes, Making sense of mass destruction: quantitating MHC class I antigen presentation, *Nat. Rev. Immunol.* 3 (2003) 952–961.
- [7] M. Del Val, D. López, Multiple proteases process viral antigens for presentation by MHC class I molecules to CD8(+) T lymphocytes, *Mol. Immunol.* 39 (2002) 235–247.
- [8] J.W. Yewdell, L.C. Antón, J.R. Bennink, Defective ribosomal products (DRiPs): a major source of antigenic peptides for MHC class I molecules? *J. Immunol.* 157 (1996) 1823–1826.
- [9] E.A. Reits, J.C. Vos, M. Gromme, J. Neefjes, The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins, *Nature* 404 (2000) 774–778.
- [10] U. Schubert, L.C. Antón, J. Gibbs, C.C. Norbury, J.W. Yewdell, J.R. Bennink, Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes, *Nature* 404 (2000) 770–774.
- [11] D.N. Wheatley, M.R. Giddings, M.S. Inglis, Kinetics of degradation of 'short-' and 'long-lived' proteins in cultured mammalian cells, *Cell Biol. Int. Rep.* 4 (1980) 1081–1090.



- [12] R. Gavioli, T. Frisan, S. Vertuani, G.W. Bornkamm, M.G. Masucci, c-myc overexpression activates alternative pathways for intracellular proteolysis in lymphoma cells, *Nat. Cell Biol.* 3 (2001) 283–288.
- [13] R. Glas, M. Bogoy, J.S. McMaster, M. Gaczynska, H.L. Ploegh, A proteolytic system that compensates for loss of proteasome function, *Nature* 392 (1998) 618–622.
- [14] E. Geier, G. Pfeifer, M. Wilm, M. Lucchiari-Hartz, W. Baumeister, K. Eichmann, G. Niedermann, A giant protease with potential to substitute for some functions of the proteasome, *Science* 283 (1999) 978–981.
- [15] J. Diekmann, E. Adamopoulou, O. Beck, G. Rauser, S. Lurati, S. Tenzer, H. Einsele, H.G. Rammensee, H. Schild, M.S. Topp, Processing of two latent membrane protein 1 MHC class I epitopes requires tripeptidyl peptidase II involvement, *J. Immunol.* 183 (2009) 1587–1597.
- [16] S. Guil, M. Rodríguez-Castro, F. Aguilar, E.M. Villasevil, L.C. Antón, M. Del Val, Need for tripeptidyl-peptidase II in major histocompatibility complex class I viral antigen processing when proteasomes are detrimental, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 39925–39934.
- [17] U. Seifert, C. Marañón, A. Shmueli, J.F. Desoutter, L. Wesoloski, K. Janek, P. Henklein, S. Diescher, M. Andrieu, H. de la Salle, T. Weinschenk, H. Schild, D. Laderach, A. Galy, G. Haas, P.M. Kloetzel, Y. Reiss, A. Hosmalin, An essential role for tripeptidyl peptidase in the generation of an MHC class I epitope, *Nat. Immunol.* 4 (2003) 375–379.
- [18] B. Tomkinson Test, Tripeptidyl-peptidase II: a multi-purpose peptidase, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37 (2005) 1933–1937.
- [19] E. Reits, J. Neijssen, C. Herberts, W. Benckhuijsen, L. Janssen, J.W. Drijfhout, J. Neefjes, A major role for TPPII in trimming proteasomal degradation products for MHC class I antigen presentation, *Immunity* 20 (2004) 495–506.
- [20] M.F. Princiotta, U. Schubert, W. Chen, J.R. Bennink, J. Myung, C.M. Crews, J.W. Yewdell, Cells adapted to the proteasome inhibitor 4-hydroxy-5-iodo-3-nitrophenylacetyl-Leu-Leu-leucinal-vinyl sulfone require enzymatically active proteasomes for continued survival, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98 (2001) 513–518.
- [21] E.W. Wang, B.M. Kessler, A. Borodovsky, B.F. Cravatt, M. Bogoy, H.L. Ploegh, R. Glas, Integration of the ubiquitin–proteasome pathway with a cytosolic oligopeptidase activity, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97 (2000) 9990–9995.
- [22] X. Hong, L. Lei, R. Glas, Tumors acquire inhibitor of apoptosis protein (IAP)-mediated apoptosis resistance through altered specificity of cytosolic proteolysis, *J. Exp. Med.* 197 (2003) 1731–1743.
- [23] M. Zhou, X. Wu, H.N. Ginsberg, Evidence that a rapidly turning over protein, normally degraded by proteasomes, regulates hsp72 gene transcription in HepG2 cells, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 24769–24775.
- [24] K.T. Bush, A.L. Goldberg, S.K. Nigam, Proteasome inhibition leads to a heat-shock response, induction of endoplasmic reticulum chaperones, and thermotolerance, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 9086–9092.
- [25] L.C. Antón, H.L. Snyder, J.R. Bennink, A. Vinitzky, M. Orlowski, A. Porgador, J.W. Yewdell, Dissociation of proteasomal degradation of biosynthesized viral proteins from generation of MHC class I-associated antigenic peptides, *J. Immunol.* 160 (1998) 4859–4868.
- [26] J.A. Johnston, C.L. Ward, R.R. Kopito, Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins, *J. Cell Biol.* 143 (1998) 1883–1898.
- [27] L.C. Antón, U. Schubert, I. Bacik, M.F. Princiotta, P.A. Wearsch, J. Gibbs, P.M. Day, C. Realini, M.C. Rechsteiner, J.R. Bennink, J.W. Yewdell, Intracellular localization of proteasomal degradation of a viral antigen, *J. Cell Biol.* 146 (1999) 113–124.
- [28] R. García-Mata, Z. Bebo, E.J. Sorscher, E.S. Sztul, Characterization and dynamics of aggresome formation by a cytosolic GFP-chimeras, *J. Cell Biol.* 146 (1999) 1239–1254.
- [29] W.C. Wigley, R.P. Fabunmi, M.G. Lee, C.R. Marino, S. Muallem, G.N. DeMartino, P.J. Thomas, Dynamic association of proteasomal machinery with the centrosome, *J. Cell Biol.* 145 (1999) 481–490.
- [30] Y. Kawaguchi, J.J. Kovacs, A. McLaurin, J.M. Vance, A. Ito, T.P. Yao, The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress, *Cell* 115 (2003) 727–738.
- [31] C. Wójcik, D. Schroeter, S. Wilk, J. Lamprecht, N. Paweletz, Ubiquitin-mediated proteolysis centers in HeLa cells: indication from studies of an inhibitor of the chymotrypsin-like activity of the proteasome, *Eur. J. Cell Biol.* 71 (1996) 311–318.
- [32] M.Y. Sherman, A.L. Goldberg, Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases, *Neuron* 29 (2001) 15–32.
- [33] T. Hideshima, J.E. Bradner, J. Wong, D. Chauhan, P. Richardson, S.L. Schreiber, K.C. Anderson, Small-molecule inhibition of proteasome and aggresome function induces synergistic antitumor activity in multiple myeloma, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102 (2005) 8567–8572.
- [34] S.T. Nawrocki, J.S. Carew, M.S. Pino, R.A. Highshaw, R.H.I. Andtbacka, K. Dunner Jr., A. Pal, W.G. Bornmann, P.J. Chiao, P. Huang, H. Xiong, J.L. Abbruzzese, D.J. McConkey, Aggresome disruption: a novel strategy to enhance bortezomib-induced apoptosis in pancreatic cancer cells, *Cancer Res.* 66 (2006) 3773–3781.
- [35] A. Paradela, I. Alvarez, M. Garcia-Peydro, L. Sesma, M. Ramos, J. Vazquez, J.A. Lopez de Castro, Limited diversity of peptides related to an alloreactive T cell epitope in the HLA-B27-bound peptide repertoire results from restrictions at multiple steps along the processing-loading pathway, *J. Immunol.* 164 (2000) 329–337.
- [36] S.B. Qian, D.E. Ott, U. Schubert, J.R. Bennink, J.W. Yewdell, Fusion proteins with COOH-terminal ubiquitin are stable and maintain dual functionality in vivo, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 38818–38826.
- [37] N.F. Bence, R.M. Sampat, R.R. Kopito, Impairment of the ubiquitin–proteasome system by protein aggregation, *Science* 292 (2001) 1552–1555.
- [38] Rasband, Wayne S. (2009) ImageJ <http://rsb.info.nih.gov/ij/> U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA.
- [39] P.S. Swerdlow, D. Finley, A. Varshavsky, Enhancement of immunoblot sensitivity by heating of hydrated filters, *Anal. Biochem.* 156 (1986) 147–153.
- [40] R.R. Kopito, Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation, *Trends Cell Biol.* 10 (2000) 524–530.
- [41] N.P. Dantuma, T.A.M. Groothuis, F.A. Salomons, J. Neefjes, A dynamic ubiquitin equilibrium couples proteasomal activity to chromatin remodeling, *J. Cell Biol.* 173 (2006) 19–26.
- [42] E.J. Wherry, T.N. Golovina, S.E. Morrison, G. Sinnathamby, M.J. McElhaugh, D.C. Shockey, L.C. Eisenlohr, Re-evaluating the generation of a “proteasome-independent” MHC class I-restricted CD8 T cell epitope, *J. Immunol.* 176 (2006) 2249–2261.
- [43] E.G. Mimnaugh, H.Y. Chen, J.R. Davie, J.E. Celis, L. Neckers, Rapid deubiquitination of nucleosomal histones in human tumor cells caused by proteasome inhibitors and stress response inducers: effects on replication, transcription, translation, and the cellular stress response, *Biochemistry* 36 (1997) 14418–14429.
- [44] L.A. Johnson, K.E. Moon, M. Eisenberg, Inactivation of chymotrypsin and human skin chymase: kinetics of time-dependent inhibition in the presence of substrate, *Biochim. Biophys. Acta* 953 (1988) 269–279.
- [45] C. Rose, F. Vargas, P. Facchinetti, P. Bourgeat, R.B. Bambal, P.B. Bishop, S.M. Chan, A.N. Moore, C.R. Ganellin, J.C. Schwartz, Characterization and inhibition of a cholecystokinin-inactivating serine peptidase, *Nature* 380 (1996) 403–409.
- [46] J. Huai, E. Firat, A. Nil, D. Million, S. Gaedicke, B. Kanzler, M. Freudenberger, P. van Endert, G. Kohler, H.L. Pahl, P. Aichele, K. Eichmann, G. Niedermann, Activation of cellular death programs associated with immunosenescence-like phenotype in TPPII knockout mice, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105 (2008) 5177–5182.
- [47] L. Whitesell Test, HSP90 and the chaperoning of cancer, *Nat. Rev. Cancer* 5 (2005) 761–772.
- [48] E.G. Mimnaugh, C. Chavany, L. Neckers, Polyubiquitination and proteasomal degradation of the p185<sup>c-erbB-2</sup> receptor protein-tyrosine kinase induced by geldanamycin, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 22796–22801.
- [49] L.H. Pearl, C. Prodromou, P. Workman, The Hsp90 molecular chaperone: an open and shut case for treatment, *Biochem. J.* 410 (2008) 439–453.
- [50] T.W. Schulte, L.M. Neckers, The benzoquinone ansamycin 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin binds to HSP90 and shares important biologic activities with geldanamycin, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 42 (1998) 273–279.
- [51] N. Zaarur, A.B. Meriin, V.L. Gabai, M.Y. Sherman, Triggering aggresome formation: dissecting aggresome-targeting and aggregation signals in synphilin 1, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 27575–27584.
- [52] J. Luo Test, G protein-coupled receptor kinase interaction with Hsp90 mediates kinase maturation, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 50908–50914.
- [53] L.C. Antón, E.M. Villasevil, Is there an alternative to the proteasome in cytosolic protein degradation? *Biochem. Soc. Trans.* 36 (2008) 839–842.
- [54] D. Fuchs, C. Berges, G. Opelz, V. Daniel, C. Naujokat, Increased expression and altered subunit composition of proteasomes induced by continuous proteasome inhibition establish apoptosis resistance and hyperproliferation of Burkitt lymphoma cells, *J. Cell. Biochem.* 103 (2007) 270–283.
- [55] T. Rückrich, M. Kraus, J. Gogel, A. Beck, H. Ovaa, M. Verdoes, H.S. Overkleeft, H. Kalbacher, C. Driessen, Characterization of the ubiquitin–proteasome system in bortezomib-adapted cells, *Leukemia* 23 (2009) 1098–1105.
- [56] B. Kessler, X. Hong, J. Petrovic, A. Borodovsky, N.P. Dantuma, H.S. Overkleeft, H. Ploegh, R. Glas, Pathways accessory to proteasomal proteolysis are less efficient in major histocompatibility complex class I antigen production, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 10013–10021.
- [57] V. Stavropoulou, J. Xie, M. Henriksson, B. Tomkinson, S. Imreh, M.G. Masucci, Mitotic infidelity and centrosome duplication errors in cells overexpressing tripeptidyl-peptidase II, *Cancer Res.* 65 (2005) 1361–1368.
- [58] V. Stavropoulou, V. Vasquez, B. Cereser, E. Freda, M.G. Masucci, TPPII promotes genetic instability by allowing the escape from apoptosis of cells with activated mitotic checkpoints, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 346 (2006) 415–425.
- [59] H.E. Moore, E.L. Davenport, E.M. Smith, S. Muralikrishnan, A.S. Dunlop, B.A. Walker, D. Krige, A.H. Drummond, L. Hooftman, G.J. Morgan, F.E. Davies, Aminopeptidase inhibition as a targeted treatment strategy in myeloma, *Mol. Cancer Ther.* 8 (2009) 762–770.
- [60] K. Sekine, H. Fujii, F. Abe, Induction of apoptosis by bestatin (ubenimex) in human leukemic cell lines, *Leukemia* 13 (1999) 729–734.
- [61] I.A. York, N. Bhutani, S. Zenzian, A.L. Goldberg, K.L. Rock, Tripeptidyl peptidase II is the major peptidase needed to trim long antigenic precursors, but is not required for most MHC class I antigen presentation, *J. Immunol.* 177 (2006) 1434–1443.
- [62] A.F. Kisselev, A. Callard, A.L. Goldberg, Importance of the different proteolytic sites of the proteasome and the efficacy of inhibitors varies with the protein substrate, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 8582–8590.
- [63] R.M. McKay, J.P. McKay, J.M. Suh, L. Avery, J.M. Graff, Tripeptidyl peptidase II promotes fat formation in a conserved fashion, *EMBO Rep.* 8 (2007) 1183–1189.
- [64] E. Firat, J. Huai, L. Saveanu, S. Gaedicke, P. Aichele, K. Eichmann, P. van Endert, G. Niedermann, Analysis of direct and cross-presentation of antigens in TPPII knockout mice, *J. Immunol.* 179 (2007) 8137–8145.
- [65] M. Kawahara, I.A. York, A. Hearn, D. Farfan, K.L. Rock, Analysis of the role of tripeptidyl peptidase II in MHC class I antigen presentation in vivo, *J. Immunol.* 183 (2009) 6069–6077.
- [66] J.C. Young, I. Moarefi, F.U. Hartl, Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool, *J. Cell Biol.* 154 (2001) 267–273.
- [67] J. Höfheld, D.M. Cyr, C. Patterson, From the cradle to the grave: molecular chaperones that may choose between folding and degradation, *EMBO Rep.* 2 (2001) 885–890.
- [68] P. Connell, C.A. Ballinger, J. Jiang, Y. Wu, L.J. Thompson, J. Höfheld, C. Patterson, The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins, *Nat. Cell Biol.* 3 (2001) 93–96.
- [69] B. Crosas, J. Hanna, D.S. Kirkpatrick, D.P. Zhang, Y. Tone, N.A. Hathaway, C. Buckner, D.S. Leggett, M. Schmidt, R.W. King, S.P. Gygi, D. Finley, Ubiquitin chains are remodeled at the proteasome by opposing ubiquitin ligase and deubiquitinating activities, *Cell* 127 (2006) 1401–1413.

- [70] S. Rumpf, S. Jentsch, Functional division of substrate processing cofactors of the ubiquitin-selective Cdc48 chaperone, *Mol. Cell* 21 (2006) 261–269.
- [71] M. Cavo, Proteasome inhibitor bortezomib for the treatment of multiple myeloma, *Leukemia* 20 (2006) 1341–1352.
- [72] W. Xu, L. Neckers, Targeting the molecular chaperone heat shock protein 90 provides a multifaceted effect on diverse cell signaling pathways of cancer cells, *Clin. Cancer Res.* 13 (2007) 1625–1629.
- [73] R. Bagatell, L. Gore, M.J. Egorin, R. Ho, G. Heller, N. Boucher, E.G. Zuhowski, J.A. Whitlock, S.P. Hunger, A. Narendran, H.M. Katzenstein, R.J. Arceci, J. Boklan, C.E. Herzog, L. Whitesell, S.P. Ivy, T.M. Trippett, Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of 17-n-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in pediatric patients with recurrent or refractory solid tumors: a pediatric oncology experimental therapeutics investigators consortium study, *Clin. Cancer Res.* 13 (2007) 1783–1788.